

**Analyse der *Helicobacter pylori*-induzierten  
Immunantwort im Immunisierungs- und  
Infektionsmodell von *Meriones unguiculatus***



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER  
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE  
UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von  
Stefanie Denk

aus Passau  
im Jahr 2011

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 30.06.2011

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. Wulf Schneider

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Wirth

Erstgutachterin: Prof. Dr. Inga Neumann

Zweitgutachter: PD Dr. Wulf Schneider

Drittprüfer: Prof. Dr. med. Karl Kunzelman

# Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise entgeltlich/unentgeltlich geholfen:

1. Prof. Dr. Norbert Lehn
2. PD Dr. Wulf Schneider
3. Prof. Dr. Inga Neumann

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der obigen Versicherung an Eides statt wurde ich über die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Stefanie Denk  
Grafenau, 30.06.2011

---

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
3.1	<i>Helicobacter pylori</i>	9
3.1.1	Entdeckung und Bedeutung von <i>Helicobacter pylori</i>	9
3.1.2	Epidemiologie	10
3.1.3	Transmission	11
3.1.4	<i>H. pylori</i> -assoziierte Erkrankungen	12
3.1.5	Pathogenese	13
3.1.6	Die <i>Helicobacter pylori</i> -Infektion	16
3.1.7	Tiermodelle der Infektion mit <i>H. pylori</i>	27
3.2	Dendritische Zellen	30
3.3	Vorarbeiten	33
3.4	Zielsetzung	34
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>37</b>
4.1	Versuchsdurchführung	37
4.1.1	Verwendete Organismen	37
4.1.2	<i>Helicobacter pylori</i>	37
4.1.3	Klonierung von Gerbil Genen	39
4.1.4	Charakterisierung von Dendritischen Zellen	40
4.1.5	Herstellung von gepulsten Dendritischen Zellen	43
4.1.6	Tierexperimentelle Verfahren	44
4.1.7	Serumgewinnung	46
4.1.8	Splenozytenpräparation	46
4.1.9	Nachweis von <i>H. pylori</i> durch Nested-PCR	47
4.1.10	Histologie	48
4.1.11	Reisolation von <i>H. pylori</i> zur Feststellung der Kolonisierungsdichte im Magen	48
4.1.12	Bestimmung des isotypenspezifischen Antikörpertiters	48
4.1.13	Quantitative PCR	49
4.2	Statistische Auswertung	51
4.3	Verwendete Software	51
4.4	Puffer und Lösungen	52
4.5	Reagenzien und Material	54
4.5.1	Reagenzien	54
4.5.2	Material	54
4.6	Versuchsaufbau	55
4.6.1	Modulation der <i>H. pylori</i> -induzierten Immunantwort durch Injektion von immunstimulatorischen CpG- oder GpG-Oligodeoxynukleotiden	55
4.6.2	Modulation der <i>H. pylori</i> -induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen	56
4.6.3	Modulation der <i>H. pylori</i> -induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit gepulsten Dendritischen Zellen	57



<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
5.1	<i>Klonierung von Gerbil-Genen und Etablierung einer immunologischen Analyse- methode durch quantitative PCR</i>	59
5.1.1	Klonierung bereits veröffentlichter Gerbil-Sequenzen	59
5.1.2	Klonierung von Gerbil-Sequenzen mithilfe veröffentlichter Sequenzinformationen anderer Tierarten	59
5.1.3	Klonierung weitgehend unbekannter Sequenzabschnitte	61
5.2	<i>Modulation der H. pylori-induzierten Immunantwort durch immunstimulatorische Oligodeoxynukleotide (ODNs)</i>	63
5.2.1	Wirkungsweise von CpG- oder GpG-ODNs im Gerbil-Tiermodell	63
5.2.2	Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte Immunantwort	65
5.3	<i>Modulation der H. pylori-induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen</i>	89
5.3.1	Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die <i>H. pylori</i> -induzierte Bildung spezifischer Antikörper nach vier und acht Wochen	90
5.3.2	PCR-Nachweis von <i>H. pylori</i> -DNA im Magengewebe	92
5.3.3	Anzuchtversuch und Analyse der Kolonisierungsdichte	94
5.3.4	Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz- Kombinationen auf die <i>H. pylori</i> -induzierte Histologie des Magens	96
5.3.5	Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression im Magengewebe	100
5.4	<i>Modulation der H. pylori-induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit Dendritischen Zellen</i>	126
5.4.1	Expression von GM-CSF, Differenzierung und Charakterisierung von Dendritischen Zellen aus <i>Meriones unguiculatus</i>	126
5.4.2	Stimulationsfähigkeit der Dendritischen Zellen <i>in vitro</i>	138
5.4.3	Modulation der <i>H. pylori</i> -induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit Dendritischen Zellen	140
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>156</b>
6.1	<i>Das Gerbil-Tiermodell der H. pylori-Infektion</i>	156
6.2	<i>Klonierung von Gerbil-Genen und Etablierung einer immunologischen Analyse- methode durch quantitative PCR</i>	158
6.3	<i>Modulation der H. pylori-induzierten Immunantwort durch immunstimulatorische Oligodeoxynukleotide (ODNs)</i>	161
6.4	<i>Modulation der H. pylori-induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen</i>	170
6.5	<i>Modulation der H. pylori-induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit Dendritischen Zellen</i>	179
6.5.1	Herstellung und Charakterisierung von Dendritischen Zellen aus <i>Meriones unguiculatus</i>	180
6.5.2	Modulation der <i>H. pylori</i> -induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit Dendritischen Zellen	183
6.6	<i>Fazit</i>	186

---

<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>I</b>
7.1	<i>Veröffentlichungen und Kongressbeiträge</i>	<i>I</i>
7.1.1	Veröffentlichungen	I
7.1.2	Kurzbeiträge	II
7.1.3	Kongressbeiträge	III
7.2	<i>Verzeichnisse</i>	<i>V</i>
7.2.1	Abbildungsverzeichnis	V
7.2.2	Tabellenverzeichnis	VII
7.3	<i>Nukleotid-Sequenzen von Meriones unguiculatus</i>	<i>VIII</i>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>XIII</b>

## 1 Zusammenfassung

*Helicobacter pylori* ist ein humanpathogenes Bakterium, das den menschlichen Magen kolonisiert und dadurch die Ausbildung einer Immunantwort des Wirts induziert. Diese wird hauptsächlich von T-Helfer-Zellen (Th) beeinflusst, die eine Prägung vom Typ Th1 auszeichnet. Charakteristisch für diese Art der Immunantwort ist die Bildung proinflammatorischer Zytokine mit dem Leitzytokin IFN- $\gamma$ . Doch trotz dieser Reaktion des Immunsystems kommt es normalerweise zu einer lebenslangen Persistenz des Bakteriums. Die auftretende Immunantwort ist also nicht in der Lage, eine effektive Eradikation von *H. pylori* zu erreichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl immunologischer Parameter während einer Infektion mit *H. pylori* im Tiermodell von *Meriones unguiculatus* (Gerbil) analysiert und mit auftretenden histopathologischen Veränderungen der Magenschleimhaut korreliert. Bei diesen Tieren kommt es, z.B. im Gegensatz zu Mäusen, durch eine Infektion mit *H. pylori* schon nach kurzer Zeit zu einer sehr starken Ausprägung von Entzündungserscheinungen im Magen. Durch die Verabreichung von immunstimulatorischen Substanzen sollte die durch das Bakterium hervorgerufene Reaktion des Immunsystems gezielt modifiziert werden. Oligodeoxynukleotide (ODNs) mit bestimmten bakteriellen Sequenzmotiven sind in der Lage, eine Reaktion des angeborenen Immunsystems über die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren zu induzieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Verabreichung von CpG-ODNs zu einer Th1-geprägten Immunantwort führt, während der Austausch von nur einer Base von C zu G die Aktivierung von Th1-T-Zellen inhibieren kann. Ein Einsatz von CpG-ODNs im *H. pylori*-Infektionsmodell könnte also zu einer Verstärkung der Th1-Immunantwort und damit auch der Entzündungserscheinungen im Magen führen. Der Einsatz von GpG-ODNs würde hingegen die durch das Bakterium ausgelöste proinflammatorische Reaktion des Immunsystems inhibieren und zu einer Abschwächung der histopathologischen Veränderung im Magengewebe beitragen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden CpG-ODNs oder GpG-ODNs intraperitoneal kurz vor, während und nach der Infektion mit *H. pylori* injiziert. Bei allen infizierten Gerbils kam es zur starken Bildung von gegen das Bakterium gerichteten Antikörpern. In infizierten Tieren konnten im Antrum typische histopathologische Veränderungen der Magenschleimhaut beobachtet werden. Durch eine quantitative PCR wurde die RNA-

Expression verschiedener immunologischer Parameter analysiert. Dabei führte die Verabreichung der beiden ODNs im Vergleich zu nur mit *H. pylori* infizierten Gerbils zu einer vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen im Magengewebe, vor allem von IL-6 und TNF. Das CpG-ODN konnte die *H. pylori*-induzierte Th1-gerichtete Reaktion des Immunsystems also verstärken, führte jedoch zu keiner Veränderung der histopathologischen Auswirkungen im Magengewebe. GpG-ODNs übten keinerlei inhibitorischen Effekt auf die Th1-Immunantwort aus.

In der Literatur wird eine Th1-dominierende Immunantwort mit Beteiligung von Th2 und den daran beteiligten Leitzytokinen IL-4 und IL-10 als möglicherweise effektivste Methode zur Eradikation von *H. pylori* favorisiert. Cholera-Toxin (CT) ist als starkes Th2-Adjuvanz bekannt. Im Gegensatz dazu führen CpG-ODN und *H. pylori*-Lysat zu einer Th1-geprägten Reaktion des Immunsystems. Durch eine kombinierte Verabreichung könnte also im *H. pylori*-Infektionsmodell eine protektive Immunantwort ausgelöst werden. Daher wurden die beiden Adjuvanzen CpG-ODN und CT zusammen mit *H. pylori*-Lysat vor der Infektion mit dem Bakterium verabreicht. Um eine längerfristige Beobachtung zu ermöglichen, wurde zusätzlich zum bisherigen Kurzzeitinfektionsmodell nach vier Wochen ein weiterer Untersuchungszeitpunkt nach acht Wochen festgesetzt. Außerdem wurde ein Anzuchtversuch von *H. pylori* aus dem Magen durchgeführt, um einen Einfluss der Behandlung auf die Kolonisierungsdichte beobachten zu können. Bei allen immunisierten Gerbils kam es zu einer starken Bildung von gegen das Bakterium gerichteten Antikörpern, ebenso wie bei infizierten Tieren, in diesen Fällen allerdings etwas weniger stark ausgeprägt. Der Anzuchtversuch aus dem Gerbil-Magen führte bei allen infizierten Tieren zu einem Wachstum von *H. pylori*, das durch die unterschiedlichen Behandlungen nicht beeinflusst wurde. Im Magengewebe zeigten sich bei infizierten Tieren sehr stark ausgeprägte histopathologische Veränderungen, die nach acht Wochen Infektionsdauer im Vergleich zu vier Wochen noch zunahmen. Die Verabreichung von CT als Adjuvanz führte zu einer ausgeprägten Infiltration von Entzündungszellen bis in die Tiefe des Bindegewebes. In infizierten Gerbils kam es nach acht Wochen zu einer vermehrten RNA-Expression vor allem von proinflammatorischen Zytokinen im Magen. Durch die Verabreichung von CT konnte eine verstärkte Expression proinflammatorisch wirksamer Proteine festgestellt werden, aber auch die

Induktion einer regulatorischen Immunantwort durch IL-10. Insgesamt zeigten sich durch die alleinige Infektion mit *H. pylori* starke proinflammatorische Vorgänge, die mit längerer Infektionsdauer weiter zunahmen. Vor allem der Einsatz von CT führte zu einer starken Expression proinflammatorischer Proteine im Magengewebe und zu ausgeprägten histopathologischen Veränderungen im Magengewebe. Der Einfluss von IL-10 zeigte keinerlei regulatorische Wirkung auf die Ausprägung der Entzündungsreaktion.

Dendritische Zellen (DCs) spielen eine wichtige Rolle in der initialen Phase einer Immunantwort, indem sie Antigene aufnehmen und an ihrer Oberfläche anderen Zellen des Immunsystems präsentieren. Die Aufnahme von Antigenen kann auch *in vitro* durchgeführt werden, dieser Vorgang wird „Pulsen“ genannt. Durch die zentrale Rolle von DCs in der initialen Phase einer *H. pylori*-Infektion, könnte ein Transfer von mit *H. pylori*-Antigenen gepulsten DCs zu einer protektiven Reaktion des Immunsystems führen. Um die Rolle dieser Zellen zu analysieren, wurde zuerst ein Zellkultur-System zur Herstellung von DCs aus Gerbil-Knochenmark etabliert. Die Dendritischen Zellen wurden dazu mit *H. pylori*-Lysat und -RNA gepulst. Die Verwendung von RNA zum Pulsen von DCs hatte sich zuvor in einem Mausmodell mit *Candida albicans* als vielversprechender Ansatz zur Abwehr einer Infektion herausgestellt. Die DCs wurden vor der Infektion der Gerbils mit *H. pylori* intraperitoneal injiziert. Die Bildung von gegen das Bakterium gerichteten Antikörpern konnte in allen infizierten Gerbils nachgewiesen werden. Ebenso kam es bei allen infizierten Gerbils im Antrum zu charakteristischen histopathologischen Entzündungsreaktionen der Magenschleimhaut. Die Verabreichung von gepulsten DCs, vor allem von mit Lysat gepulsten, führte zu einer verstärkten RNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Magen. Lysat-gepulste DCs konnten die *H. pylori*-induzierte Th1-gerichtete Reaktion des Immunsystems beeinflussen, führten jedoch zu keiner Veränderung der histopathologischen Auswirkungen im Magengewebe.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit detaillierte immunologische und histologische Vorgänge im Gerbil-Tiermodell bei einer Infektion mit *H. pylori* und die Auswirkungen durch die Verabreichung immunstimulatorischer Substanzen analysiert. Insgesamt konnte dadurch ein wesentlicher Beitrag zum besseren Verständnis der durch eine Infektion mit *H. pylori* ausgelösten Immunantwort geleistet werden.

## 2 Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BB	Brucella-Bouillon
CTL	CD8 <sup>+</sup> zytolytischer T-Lymphozyt
Dent	Helicobacter Selektiv-Supplement
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FKS	Fötales Kälberserum
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Hp	<i>Helicobacter pylori</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Imm	Immunisierung
i.n.	intranasal
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
Inf	Infektion
i.p.	intraperitoneal
KBE	Koloniebildende Einheit
KC	Keratinozyten-abgeleitetes Chemokin
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>Major histocompatibility complex</i> )
MIF	Makrophagen Migrations-inhibierender Faktor
Mip-2	Makrophagen-inflammatorisches Protein 2
MOI	Multiplicity Of Infection
NO	Stickoxid
NOS	NO-Synthase
NK	Natürliche Killerzelle
OD (X nm)	Optische Dichte bei Wellenlänge X nm
ODN	Oligodeoxynukleotid

---

PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
Th	T-Helfer, z.B. Th1 (proinflammatorisch) und Th2 (antiinflammatorisch)
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
WC	Wilkins Chalgren (Agar)

## 3 Einleitung

### 3.1 *Helicobacter pylori*

#### 3.1.1 Entdeckung und Bedeutung von *Helicobacter pylori*

Der Nachweis von Bakterien im Magen ist seit langer Zeit das Ziel wissenschaftlicher Untersuchungen. Bereits im Jahre 1875 wurden spiralförmige Bakterien im Schleim des Magens entdeckt. Da es jedoch nicht gelang die Keime im Labor zu züchten, geriet diese Arbeit in Vergessenheit. Ebenso wie die Publikation des deutschen Internisten Walter Krienitz, der 1906 „Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi“ in der Deutschen Medizinischen Wochenschrift berichtete. Doch trotz dieser Arbeiten wurde der Magen damals als keimfreie Zone betrachtet. Die meisten Forscher nahmen an, dass im stark sauren Milieu kein Bakterium überleben kann.

Erst Anfang der 1980er Jahre wurden diese spiralförmigen Bakterien vom Pathologen J. R. Warren und dem Internisten und Mikrobiologen B. J. Marshall wiederentdeckt. Beide waren zu dieser Zeit am Königlichen Krankenhaus von Perth beschäftigt. Warren bemerkte, dass es bei zahlreichen Ulkus-Patienten trotz Unterdrückung der Säureproduktion im Magen immer wieder zu Rückfällen oder komplettem Therapieversagen kam. Dies widersprach jedoch dem damals vorherrschenden Dogma: „Keine Säure, kein Ulkus“. Durch seine Arbeit als Pathologe beschäftigte sich Warren mit zahlreichen Biopsien der Magenschleimhaut. Hierbei entdeckte er im Lichtmikroskop kleine, gekrümmte stabförmige Bakterien, die sich vor allem dort fanden, wo man auch die klassischen Entzündungszeichen beobachten konnte. Er vermutete, dass diese Keime bei der Entstehung von Gastritis und Ulkus ventriculi und duodeni eine Rolle spielen könnten. Von der wissenschaftlichen Gemeinde wurde diese These jedoch abgelehnt und eine Kontamination des Materials wurde als Ursache für die Keimbesiedelung der Biopsien vermutet. Zusammen mit seinem Kollegen Marshall versuchte Warren die Bakterien des Magens zu isolieren und zu vermehren. Zu Anfang schien die gängige Lehrmeinung bestätigt. Über Monate scheiterten sämtliche Anzuchtversuche aus den Magen-Gewebeproben. Doch dann kam den



beiden Forschern der Zufall zu Hilfe. Üblicherweise wurden die Nährböden nach 36 Stunden erfolgloser Bebrütung verworfen. Durch die Osterfeiertage im Jahr 1982 blieben die Kulturplatten aber versehentlich wesentlich länger im Brutschrank. Und jetzt fanden Warren und Marshall nach den Feiertagen tatsächlich die ersten heranwachsenden Kolonien. Die Inkubationszeit wurde aufgrund dieser Erkenntnis angepasst und so gelang der Nachweis des zuerst aufgrund seiner Ähnlichkeit zum besagten Genus als *Campylobacter pyloridis* beschriebenen Magenbakteriums (Marshall et al., 1984). Allerdings wurde der Zusammenhang zwischen dem Bakterium und einer Erkrankung der Magenschleimhaut von der wissenschaftlichen Gemeinde nach wie vor abgelehnt. Schließlich entschied sich Marshall, der mit einer Kombination aus Antibiotika und einem wismuthaltigem Salz bereits erfolgreich Patienten behandelt hatte, zu einem Selbstversuch. Durch eine Kontrollgastroskopie wurde zuerst sein aktueller, entzündungsfreier Zustand des Magens festgestellt. Er trank eine bakterielle Kultur mit dem zuvor erfolgreich angezüchteten *Helicobacter*. Schon nach wenigen Tagen konnte eine Gastritis durch die Besiedelung der Magenschleimhaut mit den Bakterien diagnostiziert und auch mithilfe einer Biopsie abgesichert werden. Durch die von ihm entwickelte Behandlungsmethode konnte er sich von den Symptomen auch wieder befreien. Somit waren alle Koch'schen Postulate erfüllt. Es erforderte jedoch noch einige Zeit, bis sich die heftig umstrittenen Forschungsergebnisse durchsetzen konnten. Im Jahr 2005 wurde die Arbeit von Warren und Marshall mit der höchsten wissenschaftlichen Auszeichnung geehrt. Am 10. Dezember 2005 erhielten die beiden den Nobelpreis für Physiologie und Medizin für die Entdeckung, dass sowohl Gastritis, als auch Magengeschwüre oder Peptische Ulzera die Folge einer Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* sind.

### 3.1.2 Epidemiologie

Eine Infektion mit *Helicobacter pylori* ist eine der am häufigsten vorkommenden bakteriellen Infektionen. In Entwicklungsländern erreicht die Durchseuchung mit *H. pylori* bei Kindern eine Quote von mehr als 80%, in Industrieländern kann sie auch bei weniger als 10% liegen (Kivi et al., 2006; Perez-Perez et al., 2004). Eine Infektion mit *H. pylori* findet meist in der frühen Kindheit statt und persistiert

unbehandelt für gewöhnlich ein Leben lang (Taylor et al., 1995; Rothenbacher et al., 1999; Goodman et al., 2000). Der Aufenthalt in Entwicklungsländern, mangelhafte sozioökonomische Bedingungen und genetische Veranlagung werden als Risikofaktoren für eine Infektion mit *H. pylori* betrachtet. Durch eine Verbesserung der Lebensstandards kann die Prävalenz der Infektion dramatisch gesenkt werden. In den Industrieländern scheint sowohl der sozioökonomische Hintergrund als auch die Zugehörigkeit zu bestimmten ethnischen Gruppen bei der Infektionsinzidenz eine Rolle zu spielen (Graham et al., 1991; Mendall et al., 1992).

### 3.1.3 Transmission

Menschen und Primaten sind bisher die einzigen bekannten Wirte für *H. pylori*. Eine Beteiligung von Haustieren, v.a. von Katzen an der Übertragung ist umstritten. Sie könnten zwar als Reservoir für *H. pylori* dienen, es wäre jedoch ebenso möglich, dass die Infektion vom Mensch auf das Tier übertragen wurde (Nedrud, 1999). Der menschliche Magen dient als Reservoir für das Bakterium und daraus ergeben sich folgende mögliche Übertragungswege: fäkal-oral und gastro-oral. Die Infektion über die fäkal-orale Route findet man vorwiegend in Entwicklungsländern, während eine gastro-orale Übertragung vor allem in Industrieländern vorkommt. Möglicherweise spielt Wasser als Vektor für die Transmission hierbei eine Rolle (Das et al., 2007). Der Nachweis von *H. pylori* aus Wasser konnte bisher allerdings nur mit molekularen Methoden erfolgen. Das Bakterium kann zwar lange Zeit in Wasser überleben, es verliert jedoch seine bakterielle Morphologie und lässt sich nicht mehr kultivieren (Queralto et al., 2007). Die Übertragung von *H. pylori* geschieht hauptsächlich von Mensch zu Mensch, entweder von der Mutter auf das Kind oder zwischen den Geschwistern (Lehours et al., 2007). Zumindest ist enger Kontakt wohl eine Hauptvoraussetzung für eine Übertragung. In einem Einzelfall wurde von einem Patienten berichtet, der in eine Familie einheiratete, in der Ulzera vorkamen. Der Patient entwickelte daraufhin ebenfalls ein Duodenalulcus (Marshall, 2006).

### 3.1.4 *H. pylori*-assoziierte Erkrankungen

*Helicobacter pylori* kolonisiert den menschlichen Magen. Dieser Zustand an sich ist nicht weiter gefährlich, allerdings kann sich daraus eine Reihe von gastrointestinalen Erkrankungen entwickeln. Die Infektion mit dem Bakterium erfolgt normalerweise im frühen Kindesalter, es findet jedoch eine lange Phase der Latenz statt. Die Anzeichen einer Erkrankung zeigen sich dann erst im Erwachsenenalter, Magenkrebs beispielsweise tritt normalerweise erst in hohem Alter auf. Nur eine Minderheit der Infizierten entwickelt klinische Symptome. Etwa 10-20% der *H. pylori*-positiven erkranken an einem Ulkus und ca. 1-2% an Magenkrebs (Kuipers, 1999; Ernst et al., 2000; Kudo et al., 2004). Eine Infektion mit *H. pylori* führt immer zu einer chronischen Gastritis (Blaser, 1990). Diese verläuft häufig asymptomatisch und kann Jahre oder sogar Jahrzehnte andauern. Dieser chronisch entzündliche Prozess ist die Ausgangsform vieler weiterer *H. pylori*-assoziiierter Erkrankungen. Die Entstehung von gastrischen und duodenalen Ulzera kann mit einer hohen Wahrscheinlichkeit mit einer Infektion mit *H. pylori* in Verbindung gebracht werden. Eine Behandlung der Infektion führt zum Ausheilen des Ulkus und verhindert fast vollständig ein Wiederauftreten (van der Hulst et al., 1997; Treiber et al., 1998).

Eine Kolonisierung mit *H. pylori* führt zu einer lebenslangen proinflammatorischen Immunantwort, die mit einer entsprechenden Zellschädigung gekoppelt ist. Sie führt letztendlich zu einem Verlust der normalen Architektur der Magenmukosa. Möglicherweise kommt es dabei durch die kontinuierliche Produktion von Radikalen (oxidativer und nitrosativer Stress) zu einer Schädigung der DNA. Diese Mutationen könnten dann die Entstehung von Magenkrebs begünstigen. Der Prozess der atrophischen Gastritis und intestinalen Metaplasie findet in ungefähr der Hälfte der mit *H. pylori* kolonisierten Population statt (Kuipers et al., 1995b). Es wird angenommen, dass eine Kolonisierung mit *H. pylori* das Risiko von Magenkrebs um das zehnfache erhöht, was 1994 zu einer Einstufung dieses Bakteriums als Klasse I Kanzerogen durch die WHO führte (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1994). Die Entstehung von Magenkrebs ist allerdings auch noch von anderen bakteriellen und Wirtsfaktoren abhängig. Die Magenmukosa enthält normalerweise kein lymphoides Gewebe, allerdings kann das Auftreten eines MALT-Lymphoms fast immer mit einer Kolonisierung durch *H. pylori* korreliert werden (Eidt et al., 1994). Diese

Erkrankung ist relativ selten und tritt in weniger als 1% der Infizierten auf (Parsonnet et al., 2004). Ein Großteil dieser Patienten kann durch eine Eradikation der Infektion geheilt werden. Einige Erkrankungen außerhalb des Gastrointestinaltrakts lassen sich mit einer Kolonisierung mit *H. pylori* in Verbindung bringen: Koronare Herzerkrankungen, dermatologische Funktionsstörungen, Autoimmun-Schilddrüsenerkrankung und thrombozytopenische Purpura, Eisenmangelanämie, Raynaud's Syndrom, Sklerodermie, Migräne und Guillain-Barré Syndrom. Hierbei spielen jedoch indirekte Effekte der Infektion mit *H. pylori* eine Rolle, wie z.B. die chronische Entzündungssituation.

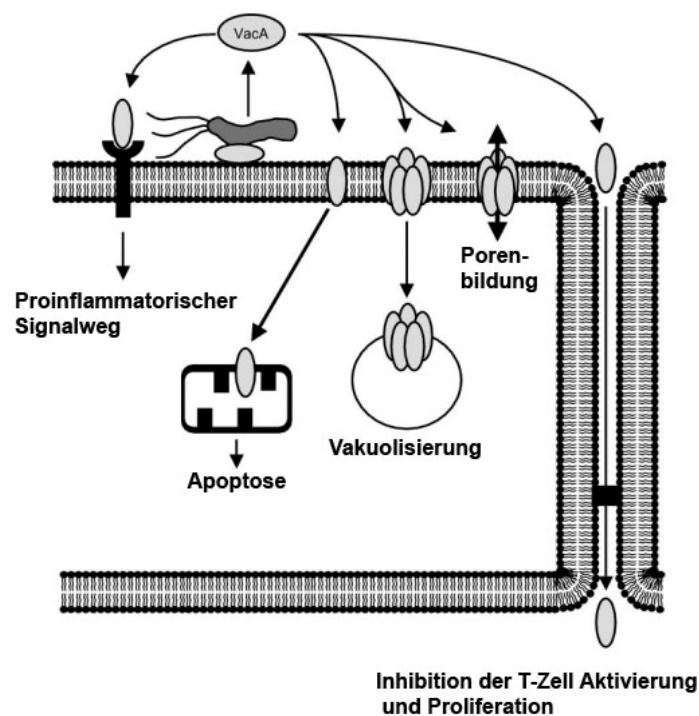
### 3.1.5 Pathogenese

Die Pathogenität einer Infektion mit *H. pylori* ergibt sich aus bakteriellen, Wirts- und Umgebungsfaktoren. Für das Bakterium spielen Pathogenitätsfaktoren wie *cytotoxin-associated gene A* (*cagA*), *vacuolating toxin A* (*vacA*) und Adhärenzfaktoren für eine Anheftung an das Magenepithel eine Rolle. Auf der Seite des Wirts sind Faktoren wie Blutgruppenantigene, HLA-Typ, Polymorphismen in Genen der angeborenen Immunantwort wie z.B. TLR4, Zytokin-Polymorphismen etwa für IL-1 $\beta$ , Alter und Ernährungsgewohnheiten von Bedeutung.

*H. pylori* kann in der sauren Umgebung des Magens überleben, obwohl das Bakterium nicht acidophil ist. Das schnelle Erreichen von Bereichen mit neutralem pH-Wert ist daher von großer Bedeutung (Schreiber et al., 2004). Einer der wichtigsten Faktoren der Säureresistenz des Bakteriums ist dabei das stark immunogene Enzym Urease. In allen bisher gefundenen *H. pylori* Isolaten ist das Protein aktiv, auch wenn sich die Ureaseaktivität zwischen den einzelnen Stämmen und den jeweiligen Wachstumsbedingungen sehr unterscheidet (van Vliet et al., 2001; Contreras et al., 2003). Urease ist in der Lage, Harnstoff in Ammoniak und Carbamat zu spalten, welches spontan in ein anderes Ammoniakmolekül und Kohlendioxid zerfallen kann (Burne et al., 2000). Der dabei entstehende Ammoniak hebt den pH-Wert an. Die beiden Spaltprodukte Ammoniak und Kohlendioxid spielen in der Pathogenese der *H. pylori*-Infektion eine wichtige Rolle. Ammoniak übt einen zytotoxischen Effekt auf die Epithelzellen des Magens aus, Kohlendioxid kann den bakteriziden Effekt, der durch

nitrosativen Stress ausgeübt wird, supprimieren (Smoot, 1997; Kuwahara et al., 2000).

Die Adhäsion des Bakteriums an Epithelzellen stellt einen weiteren wichtigen Schritt in der Pathogenese von *H. pylori* dar. Es gibt eine Vielzahl von bakteriellen Faktoren, die die Adhäsion vermitteln, Beispiele dafür sind die Adhäsionsfaktoren BabA, OipA und SabA. Einige dieser Faktoren spielen bei der Virulenz von *H. pylori* eine Rolle, da sie sich mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren lassen (Gerhard et al., 1999). Andererseits können diese Adhäsionsfaktoren auch immunologische Auswirkungen haben, z.B. die Auslösung einer proinflammatorischen Immunreaktion (Yamaoka et al., 2000).



**Abbildung 1: Die vielfältigen Wirkungen des Pathogenitätsfaktors VacA**

Der ursprünglich namensgebende Effekt der Vakuolisierung von Epithelzellen kann nur *in vitro* beobachtet werden. An der Oberfläche von Epithelzellen führt VacA zur Bildung von Poren und damit zur Freisetzung von Harnstoff und Nährstoffen. VacA kann sich in Mitochondrien einlagern und dort zur Apoptose von Epithelzellen führen. Durch Interaktion mit Epithelzellen kann ein proinflammatorischer Signalweg ausgelöst werden. Sobald es in tiefere Gewebsschichten eindringt, kann VacA mit Immunzellen interagieren und führt zu einer Inhibition der T-Zell Aktivierung und Proliferation.

(verändert nach Kusters et al., Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection, 2006)

Ungefähr die Hälfte aller *H. pylori* Stämme sekretiert VacA, ein sehr immunogenes Protein, welches *in vitro* zu einer starken Vakuolisierung von Epithelzellen führt (Terebiznik et al., 2006). VacA spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von peptischen Ulzera und Magenkrebs (Atherton et al., 1995; Wada et al., 2004). Obwohl VacA für das *in vitro* Wachstum von *H. pylori* nicht essentiell ist, trägt das Protein deutlich zur Kolonisierung des Magens in Mäusen bei (Marchetti et al., 1995). VacA induziert die Bildung von Membranporen in Epithelzellen und führt damit zum Austritt von Harnstoff und Anionen aus der Wirtszelle. Das Protein ist in der Lage, in das Zytosol vorzudringen und Apoptose in den betroffenen Zellen auszulösen (Kuck et al., 2001; Cover et al., 2003). Dieser Effekt ist abhängig vom Zelltyp und könnte auf Magenepithelzellen, wie beispielsweise Belegzellen, beschränkt sein (Neu et al., 2002; Boncristiano et al., 2003; Gebert et al., 2003; Sundrud et al., 2004). Dadurch käme es zu einer verminderten Produktion von Magensäure (Kobayashi et al., 1996; Neu et al., 2002). Das sekretierte VacA kann allerdings auch in tiefere Gewebeschichten vordringen, um dort mit verschiedenen Immunzellen wie Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zu interagieren. Dies führt dann zu einer Inhibition der Antigenpräsentation und einer verminderten T-Zell Proliferation (Molinari et al., 1998).

Die „Pathogenitätsinsel“ von *H. pylori* ist einer der wichtigsten Virulenzmarker des Bakteriums. Das *cagA*-Gen ist in etwa 50-70% aller *Helicobacter*-Stämme vorhanden und dient als Marker für das Vorhandensein der genomischen PAI (Tummuru et al., 1993; Cover et al., 1995; Ching et al., 1996). *H. pylori*-Stämme mit dieser PAI werden als CagA<sup>+</sup> Stämme bezeichnet. Patienten, die mit einem CagA<sup>+</sup> Stamm infiziert sind, entwickeln meist stärkere Entzündungsreaktionen und bei ihnen besteht ein deutlich höheres Risiko einer symptomatischen Erkrankung (Kuipers et al., 1995a; Blaser et al., 1996; van Doorn et al., 1999). Ein Großteil der PAI-kodierten Proteine dient zur Ausbildung eines Typ-IV-Sekretionsapparats. Dadurch wird eine spritzenähnliche Struktur geformt, die in der Lage ist, Magenepithelzellen zu durchdringen und die Translokation von CagA, Peptidoglycan und möglicherweise noch anderen bakteriellen Faktoren in die Zielzelle zu erleichtern (Covacci et al., 1993; Segal et al., 1999; Asahi et al., 2000; Christie et al., 2000; Odenbreit et al., 2000; Fischer et al., 2001; Odenbreit et al., 2001). Sobald CagA in die Zelle eingedrungen ist, wird es phosphoryliert und kann dann mit einer Reihe von Wirtssignalmolekülen interagieren, welches sich in

morphologischen Veränderungen der Epithelzellen zeigt (Moese et al., 2004; Naumann et al., 1999; Selbach et al., 2004; Segal et al., 1999). Die Phosphorylierung von CagA wird durch wirtseigene Kinasen kontrolliert, was durch eine Feedbackschleife zu einer reduzierten Virulenz führt und damit möglicherweise eine lebenslange Kolonisierung mit dem Bakterium ermöglicht (Tsutsumi et al., 2003; Selbach et al., 2003). Die cag PAI beeinflusst auch die Immunreaktion, da sie in der Lage ist, in T-Zellen Apoptose auszulösen (Tsutsumi et al., 2003; Selbach et al., 2003). Durch die Interaktion der Typ-IV-Struktur mit der Wirtszelle kommt es zu einer Induktion von proinflammatorischen Zytokinen in Epithelzellen (Segal et al., 1999; Wang et al., 2001a).

### **3.1.6 Die *Helicobacter pylori*-Infektion**

#### **3.1.6.1 Magen – Aufbau und Struktur**

Der Säuger-Magen ist ein mit einer Schleimhaut ausgekleideter Muskelsack. In ihm wird die in der Mundhöhle begonnene Verarbeitung der Nahrung fortgesetzt. Der Magen dient dabei als Reservoir, in dem die Nahrung mit Magensaft vermischt, chemisch zerkleinert und anschließend portionsweise ins Duodenum abgegeben wird. Der Magen lässt sich makroskopisch in folgende Abschnitte einteilen:

- Cardia: Bereich um den Mageneingang in den die Speiseröhre mündet; ein Magenverschluss, der den Reflux verhindert
- Fundus: liegt als kuppelförmige Wölbung neben dem Mageneingang
- Corpus: Hauptmasse des Magens
- Antrum: Erweiterung kurz vor dem Pylorus
- Die Incisura angularis (Angulus) trennt Corpus und Antrum
- Pylorus: Schließmuskel, eine kräftige Ringmuskelschicht am Übergang des Magens zum Duodenum

Bei Nagetieren findet man im Bereich des Fundus als Besonderheit die *Pars nonglandularis*. Dieser drüsenlose Bereich dient hauptsächlich dem besseren Aufschluss der Nahrung und erfüllt zusätzlich eine Vorratsfunktion. Im Bereich der Cardia und des Fundus finden sich die Nebenzellen, die durch die Bildung von mukösem Schleim die Mageninnenwand vor der Selbstverdauung durch Pepsin und HCl schützen. Der Korpus stellt den größten Teil des Magens dar. In ihm

befinden sich die Haupt- und Belegzellen zur Produktion von Pepsinogen und HCl. Das Pepsinogen wird durch den Einfluss von HCl zum Verdauungsenzym Pepsin gespalten. Das Antrum ist eine Erweiterung kurz vor dem Pylorus und vor allem für die Produktion des Hormons Gastrin verantwortlich. Dieses wird von den G-Zellen in Antrum und Duodenum gebildet und von dort über Blutgefäße zu seinen Wirkungsorten transportiert. Dieses Peptidhormon übt unter anderem den stärksten Reiz für die Ausschüttung von Magensäure aus.

### **3.1.6.2 Immunbiologie einer Infektion mit *H. pylori***

#### **3.1.6.2.1 Beteiligte immunologisch wirksame Proteine**

Der menschliche Magen kann durch das Bakterium *H. pylori* kolonisiert werden. Dadurch kommt es zu einer Reaktion des Immunsystems, in der vor allem CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen eine wichtige Rolle spielen (Lundgren et al., 2005; Bimczok et al., 2010). Diese Zellen sekretieren immunmodulatorische Proteine und beeinflussen damit den Verlauf der Immunantwort. Die Infektion mit *H. pylori* führt dabei zu einer Sekretion von hauptsächlich Th1-geprägten proinflammatorischen Zytokinen (Mattapallil et al., 2000).

Experimente mit Knockout-Mäusen und transgenen Mutanten konnten in hohem Maße zum heute verfügbaren Wissen immunologischer Abläufe der *H. pylori*-Infektion beitragen. Sobald Mäuse mit Deletionen in regulierenden Zytokinen mit dem Bakterium infiziert werden, wird die Bedeutung der einzelnen Proteine am gesamten Entzündungsgeschehen sichtbar. So existieren Mäuse, die bestimmte Zytokine wie Interleukin-12 (IL-12) (Hoffman et al., 2003) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Obonyo et al., 2002; Panthel et al., 2003), Rezeptoren wie den *Toll-like-receptor 4* (TLR4) (Poltorak et al., 1998) oder Proteine immunologischer Signalkaskaden wie MyD88 (Michelsen et al., 2004) nicht mehr funktionell exprimieren können. Auch Mäuse mit schweren, kombinierten Immundefekten sind verfügbar (*severe combined immune deficiency* = SCID) (Eaton et al., 2004).

Die wichtige Bedeutung von IFN- $\gamma$  für den Grad der Ausprägung der Entzündungsreaktion wurde durch die Infektion von IL-4 -/- und IFN- $\gamma$ -defizienten Mäusen sichtbar. Die durch *H. pylori* ausgelösten Entzündungsreaktionen waren bei IL-4 -/- Mäusen stärker ausgeprägt als beim Wildtyp, hingegen zeigte sich bei IFN- $\gamma$  -/- Mäusen keine Inflammation im Magengewebe (Smythies et al., 2000). In Abwesenheit von IFN- $\gamma$  kam es zu keiner Ausprägung von Gastritis, ohne IL-4 war der Anteil an Entzündungszellen im Magengewebe deutlich erhöht (Cinque et al.,



2006). Die Überexpression von IL-1 $\beta$  in transgenen Mäusen führte bei Tu et al. zu einer starken Entzündungsreaktion im Magen und der Bildung von Krebs (Tu et al., 2008). Die zentrale Bedeutung von CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen in der *H. pylori*-Infektion konnte mit CD4<sup>+</sup> T-Zell defizienten Mäusen aufgeklärt werden, sogenannten GK 1.5 Mäusen. Während es bei diesen Tieren zu einer im Vergleich zum Wildtyp normalen Sekretion von Antikörpern kam, wurde eine starke Infiltration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und damit verbundenen auffälligen histopathologischen Veränderungen beobachtet (Tan et al., 2008). Der Vergleich von Makrophagen von TLR2- und TLR4-defizienten Mäusen mit dem Wildtyp ergab, dass es durch *H. pylori* zu einer Aktivierung dieser beiden Rezeptoren kommt und dadurch zu einer Sekretion bestimmter Zytokine (Obonyo et al., 2007). Auch die regulierende Wirkung von IL-10 auf die Bildung von IL-12 wurde unter anderem mit einem Knockout-Mausmodell nachgewiesen (Obonyo et al., 2006). Bei IL-10-Knockout-Mäusen konnte beispielsweise aufgrund der fehlenden Gegenregulation von proinflammatorischen Abläufen eine stärker ausgeprägte Gastritis als beim Wildtyp beobachtet werden (Berg et al., 1998).

Zytokine spielen also bei der Infektion mit *H. pylori* eine zentrale Rolle. Das klassische Bild einer persistierenden Infektion mit schwerwiegenden Veränderungen in der Magenschleimhaut wird vor allem von proinflammatorischen Zytokinen geprägt. IL-12 ist der Hauptmediator der frühen akuten Immunantwort und hauptsächlich für die Induktion von zellulären Immunreaktionen verantwortlich. IL-12 existiert als Heterodimer mit einer 35kD (p35) und einer 40kD (p40) Untereinheit. Die Hauptquelle von IL-12 sind Makrophagen und Dendritische Zellen. Während die p35-Untereinheit von vielen unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden kann, wird die p40-Untereinheit nur von wenigen APZs sekretiert. Die Hauptaufgabe von IL-12 ist die Stimulation der IFN- $\gamma$ -Produktion durch T- und NK-Zellen. Zusätzlich fördert es die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen in IFN- $\gamma$ -produzierende Th1-Zellen. Außerdem verstärkt IL-12 die zytolytischen Funktionen von aktivierten NK-Zellen und CTLs. Bei einer Infektion mit *H. pylori* kommt es normalerweise zu einer starken Expression von IL-12 im Magen (Pellicano et al., 2007).

IFN- $\gamma$  ist der klassische Vertreter der proinflammatorisch wirksamen Zytokine. Es wird sowohl von NK-Zellen, CD4<sup>+</sup> Th1-Zellen als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen gebildet. Die Sekretion aus NK-Zellen beschränkt sich dabei vor allem auf den angeborenen Zweig der Immunantwort und wird als Reaktion auf Kontakt mit

Mikrobenbestandteilen oder IL-12 gebildet. IFN- $\gamma$  ist das Leitzytokin der Th1-Immunantwort von T-Helfer-Zellen, indem es die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einem Th1-geprägten Profil fördert und gleichzeitig die Proliferation von Th2-Zellen inhibiert. Außerdem besitzt IFN- $\gamma$  die Fähigkeit Makrophagen zu aktivieren, indem es die Phagozytosefähigkeit und die Produktion von bakterizidem NO und reaktiven Sauerstoffspezies fördert (Corradin et al., 1991). IFN- $\gamma$  ist außerdem in der Lage, die Expression von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen auf APZs zu stimulieren. In Biopsien von Patienten mit einer *H. pylori*-Infektion konnte für IFN- $\gamma$  eine im Vergleich zu nicht-infizierten Patienten erhöhte Produktion des proinflammatorischen Zytokins beobachtet werden (Lindholm et al., 1998; Pellicano et al., 2007).

TNF ist eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine und wird hauptsächlich von Makrophagen und T-Zellen gebildet. Es ist der Hauptmediator der frühen und akuten Entzündungsreaktionen auf Kontakt mit Gram-negativen Bakterien. Dabei stellt LPS den effektivsten Stimulus zur TNF-Produktion durch Makrophagen dar. Die Sekretion von TNF durch LPS-stimulierte Makrophagen kann durch die Wirkung von IFN- $\gamma$  weiter verstärkt werden. Die lokale und systemische Wirkung von TNF ist ähnlich der von IL-1 $\beta$ , jedoch ist TNF zusätzlich noch in der Lage bei einigen Zelltypen Apoptose zu induzieren. Die Biopsien von Patienten mit einer *H. pylori*-Infektion zeigten eine im Vergleich zu nicht-infizierten Patienten erhöhte Expression von TNF (Lindholm et al., 1998).

IL-6 ist ein Zytokin mit zahlreichen Funktionen sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunantwort. Es wird von Makrophagen, Endothelzellen, T-Zellen und Fibroblasten als Antwort auf den Kontakt mit Mikroben oder anderen Zytokinen, vor allem IL-1 und TNF, gebildet. Die Hauptaufgabe von IL-6 in der adaptiven Immunantwort ist die Proliferation von Antikörper-produzierenden Plasmazellen zu stimulieren. Aufgrund dieser Wirkung wurde IL-6 lange Zeit dem Th2-Zweig der Immunantwort zugeschrieben, jedoch werden dem Zytokin mittlerweile vorwiegend proinflammatorische Eigenschaften zugeordnet (Cao et al., 2008; Kim et al., 2008). In Biopsien von Patienten mit einer *H. pylori*-Infektion zeigte sich für IL-6 eine im Vergleich zu nicht-infizierten Patienten erhöhte Expression (Gionchetti et al., 1994; Lindholm et al., 1998).

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 wird von Makrophagen, Neutrophilen, Endothel- und einigen Epithelzellen gebildet. Es gibt zwei Formen von IL-1 mit nur geringer Homologie zueinander, aber sie binden an die gleichen Oberflächenrezeptoren und zeigen dieselbe biologische Aktivität. Der größte Anteil an zirkulierendem IL-1 besteht aus IL-1 $\beta$ . Das Zytokin führt bei geringer Expression zu einer lokale Verstärkung der Inflammation, bei starker Sekretion kann es in den Blutstrom eintreten und systemische Effekt wie z.B. Fieber auslösen. Humane Magenepithelzellen reagieren auf eine Stimulation mit *H. pylori* mit einer starken Sekretion von IL-1 $\beta$  (Gooz et al., 2003). Auch in Biopsien von Patienten mit einer *H. pylori*-Infektion konnte für IL-1 $\beta$  eine im Vergleich zu nicht-infizierten Patienten erhöhte Expression beobachtet werden (Lindholm et al., 1998).

Das proinflammatorische Zytokin IL-18 gehört strukturell zur Superfamilie der IL-1 Zytokine, erfüllt allerdings eine andere Funktion. IL-18 wird von Makrophagen hauptsächlich als Reaktion auf Kontakt mit LPS gebildet und stimuliert die Produktion von IFN- $\gamma$  durch NK- und T-Zellen. Besonders in Kombination mit IL-12 ist IL-18 damit ein Vermittler der zellulären Immunität. Bei einer Infektion mit *H. pylori* wird IL-18 insbesondere von Epithelzellen gebildet (Day et al., 2004; Yamauchi et al., 2008).

Der Makrophagen-Migrations-inhibierende Faktor MIF ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches eine wichtige Rolle bei entzündlichen Erkrankungen spielt. Es wird von Makrophagen, T-Zellen, einigen Epithelzellen sowie endokrinen Zellen sezerniert. MIF zeigt eine ähnliche Funktion wie Chemokine und ist für die Regulation der Rekrutierung von Entzündungszellen verantwortlich. Eine Infektion mit *H. pylori* ist mit einer erhöhten Expression von MIF in Magenepithelzellen und Entzündungszellen assoziiert (Xia et al., 2004). Patienten mit chronischer *H. pylori*-induzierter Gastritis wiesen in Biopsien eine erhöhte Anzahl an MIF-positiven Makrophagen und T-Zellen auf, wobei diese Steigerung mit der Schwere der Erkrankung korreliert (He et al., 2005).

IL-8 ist ein Chemokin, das hauptsächlich von Makrophagen und Epithelzellen sezerniert wird. Seine Hauptaufgabe ist die spezifische Rekrutierung von Neutrophilen und es wirkt chemotaktisch auf alle Arten von beweglichen Immunzellen. In Biopsien von *H. pylori*-infizierten Patienten konnte eine gesteigerte Expression von IL-8 beobachtet werden (Gionchetti et al., 1994;

Lindholm et al., 1998; Dzierzanowska-Fangrat et al., 2008). Humane Epithelzellen reagierten auf Kontakt mit *H. pylori* mit einer erhöhten Sekretion von IL-8 (Shih et al., 2007). Mäuse besitzen kein IL-8 Homolog, allerdings gibt es hier die beiden Entsprechungen KC und Mip-2 (Boisvert et al., 1998; Zhang et al., 2001; Rogers, 2004). Die beiden Chemokine KC und Mip-2 werden hauptsächlich von Makrophagen als Antwort auf entzündliche Stimuli wie bakterielles LPS gebildet und spielen damit eine wichtige Rolle bei der Regulation von Inflammationsvorgängen.

Im Gegensatz zur vorherrschenden Th1-Immunantwort, kann eine antiinflammatorisch und regulatorisch wirksame Th2-gerichtete Reaktion des Immunsystems bei einer Infektion mit *H. pylori* nicht beobachtet werden. Das antiinflammatorische Zytokin IL-4 dient als Leitzytokin einer Th2-Immunantwort von T-Helfer Zellen, indem es die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Th2-Richtung fördert. Gleichzeitig wirkt IL-4 antagonistisch auf die Makrophagen-aktivierende Funktion von IFN- $\gamma$  und inhibiert damit zelluläre Immunreaktionen. IL-4 ist hauptsächlich für die Entwicklung von Th2-Zellen aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen verantwortlich und fungiert auch als autokriner Wachstumsfaktor für diese differenzierten Th2-Zellen. Zusätzlich führt IL-4 zu einem Klassenwechsel bei B-Zellen, woraufhin diese eine andere Klasse von Antikörpern produzieren. Das Zytokin wird vor allem von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit Th2-Prägung, als auch von aktivierten Mastzellen und Basophilen gebildet. Im Vergleich zu nicht-infizierten Patienten konnte in Biopsien von *H. pylori*-infizierten Patienten keine erhöhte Expression des antiinflammatorischen Zytokins beobachtet werden (Lindholm et al., 1998)

Das regulatorische Zytokin IL-10 kontrolliert zelluläre Immunreaktionen durch Inhibition von aktivierten Makrophagen und Dendritischen Zellen. IL-10 wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und T-Zellen (vor allem Th2) produziert. Die Regulation von IL-10 erfolgt über eine negative Feedbackschleife, da das Zytokin von aktivierten Makrophagen gebildet wird, gleichzeitig aber auch die Aktivierung der Makrophagen durch Inhibition der Sekretion von IL-12 vermindert. Zusätzlich führt IL-10 zu einer reduzierten Expression von MHC-II- und kostimulatorischen Molekülen auf Makrophagen und Dendritischen Zellen. Die Expression von IL-10 war sowohl in *H. pylori*-infizierten Mäusen, als auch Biopsien menschlicher Patienten nicht erhöht (Xie et al., 2007; Augusto et al., 2007). Es gibt

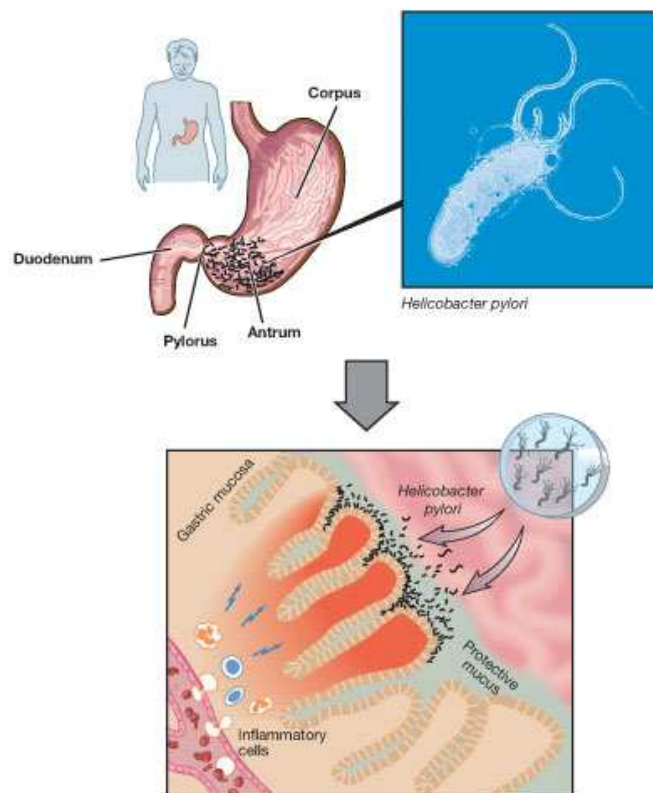
jedoch auch Fälle, in denen das genaue Gegenteil beobachtet wurde (Oderda et al., 2007; Harris et al., 2008).

Neben Zytokinen können auch immunologisch wirksame Proteine eine wichtige Rolle bei der Infektion mit *H. pylori* spielen. Das Enzym NO-Synthase, kurz NOS, katalysiert die Bildung des freien Radikals NO aus der Aminosäure L-Arginin. Trotz seiner radikalischen Eigenschaften besitzt NO eine ungewöhnlich lange Halbwertszeit von zwei bis zu 5 Sekunden, bevor das Molekül zu Nitrit oder Nitrat zerfällt. Der dadurch ausgelöste nitrosative Stress führt zu zellpathologischen Effekten. Man unterscheidet drei Isoformen der NOS, wobei zwei davon konstitutiv im Körper exprimiert werden. Nur iNOS wird erst nach Aktivierung durch Transkriptionsfaktoren vor allem von Makrophagen gebildet. Die Induktion von iNOS erfolgt durch bakterielles LPS oder proinflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF oder IL-1 $\beta$ . Humane Epithelzellen reagierten nach Kontakt mit *H. pylori* mit einer starken Expression von iNOS (Perfetto et al., 2004). Ein möglicher Pathomechanismus ist dabei die Induktion der iNOS-abhängigen Apoptose, die durch IFN- $\gamma$  stark gesteigert werden kann.

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems und spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion einer frühen Immunantwort gegen *H. pylori* (Fukata et al., 2008; Ferrero, 2005; Moss et al., 2007). Der Name Toll-like Rezeptor ist von einem Protein bei *Drosophila melanogaster* abgeleitet, das als erstes Protein dieser Familie identifiziert wurde. TLRs bestehen aus Proteinen, die zu Drosophila-Toll homolog, also Toll-like, sind. Toll-like Rezeptoren dienen der Erkennung von PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*); dabei handelt es sich um konservierte Strukturen, die ausschließlich bei Krankheitserregern vorkommen. Als wichtige Oberflächenrezeptoren der angeborenen Immunantwort sind sie z.B. für die Induktion von iNOS verantwortlich. TLRs steuern die entsprechende Aktivierung von Genen zur Einleitung und Modulation einer adaptiven Immunantwort. Im Magen sind vor allem TLR2, 4, 5 und 9 zu finden (Fukata et al., 2008). TLR-2 erkennt bakterielles Lipoprotein und Peptidoglykane überwiegend von Gram-positiven Bakterien. Murine Magenepithelzellen reagieren auf Stimulation mit *H. pylori*-LPS mit einer Induktion von TLR2, nicht jedoch TLR4. Allerdings wird diese Regulation von TLR2 durch TLR4 vermittelt (Uno et al., 2007). In humanen Neutrophilen konnte *H. pylori* eine zum Teil durch TLR2 und TLR4 vermittelte frühe Entzündungsreaktion auslösen (Alvarez-Arellano et al.,

2007). LPS von gramnegativen Bakterien interagiert mit TLR-4 und induziert die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Anand et al., 2008). In Biopsien von *H. pylori* positiven Patienten konnte eine erhöhte Expression von TLR4 im Magengewebe nachgewiesen werden. Nach Eradikation des Bakteriums erreichte die Expression von TLR4 wieder die Normalwerte der Kontrollgruppe (Asahi et al., 2007). In Magenepithelzellen konnte allerdings *in vitro* nach Stimulation mit *H. pylori* keine verstärkte Expression von TLR4 beobachtet werden (Uno et al., 2007). TLR5 reagiert auf Flagellin, das in begeißelten Bakterien vorkommt; allerdings wird *H. pylori* Flagellin nicht erkannt (Sanders et al., 2006; Galkin et al., 2008). Eine erhöhte Expression von TLR5 konnte in Magenkarzinomzellen nachgewiesen werden (Schmausser et al., 2005). Bakterielle CpG-DNA ist in der Lage direkt an TLR9 zu binden. Diese CpG-Motive kommen in Bakterien etwa 20mal häufiger vor als in Säugetieren und sind somit ein Alarmsignal für eine bakterielle Invasion. Die Aktivierung von TLR9 führt zur Freisetzung von IL-12, welches wiederum zur Stimulation von Th1-Zellen führt und damit die Brücke zur adaptiven Immunantwort schlägt. In *H. pylori*-infizierten Mäusen konnte eine erhöhte Expression von TLR9 im Magen beobachtet werden. Die Bedeutung von TLR9 in Bezug auf die Kontrolle der Lymphozytenreaktionen wurde in TLR9-Knockout-Mäusen deutlich. In diesen Tieren war sowohl die Lymphproliferation als auch die Sekretion von IFN- $\gamma$  reduziert, ebenso kam es zu einer verminderten Infiltration von Neutrophilen in die Magenschleimhaut (Anderson et al., 2007).

### 3.1.6.2.2 Ablauf einer Infektion mit *H. pylori*



**Abbildung 2: Ablauf einer Infektion mit *Helicobacter pylori***

*H. pylori* wird meist im Kindesalter oral übertragen und besiedelt den Bereich des Antrums. Das begeißelte und dadurch sehr bewegliche Bakterium ist in der Lage, sich in und unter der schützenden Schleimhautbarriere einzunisten. Hier wird eine Entzündungsreaktion hervorgerufen, die jedoch nicht in der Lage ist, die Infektion zu beseitigen.

(Abbildung: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2005/press.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/press.html))

Die Reaktion des Immunsystems auf eine Infektion mit *H. pylori* kann in zwei Phasen unterteilt werden. In einer ersten, der sogenannten angeborenen Immunantwort, erfolgt eine schnelle und unspezifische Reaktion auf charakteristische Strukturen des Bakteriums, sogenannte PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Diese Strukturen kommen nur bei Mikroben vor und sind bei allen Krankheitserregern hoch konserviert; die Erkennung erfolgt also nicht spezifisch. In dieser Phase der Immunantwort können beispielsweise Toll-like Rezeptoren (TLRs) die Erkennung von *H. pylori* vermitteln (Uno et al., 2007; Fukata et al., 2008). Toll-like Rezeptoren werden von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) wie Makrophagen und Dendritischen Zellen, aber auch von

Magenepithelzellen exprimiert (Medzhitov, 2001; Schmausser et al., 2004). Die Aktivierung von TLRs durch *H. pylori* führt zur Sekretion einer Vielzahl an proinflammatorischen Zytokinen (Schmausser et al., 2005). Dadurch werden wiederum die Haupteffektorzellen der angeborenen Immunantwort, nämlich Neutrophile, Makrophagen und NK-Zellen chemotaktisch zum Ort der Infektion gelockt (Hafsi et al., 2004; Kuo et al., 2005; Algood et al., 2007). Die Hauptaufgabe von Neutrophilen und Makrophagen liegt in der Phagozytose und damit dem Abtöten der Bakterien. Diese Zellen sezernieren zusätzlich noch Zytokine, die weitere Phagozyten rekrutieren und zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion beitragen. Die Aktivierung von NK-Zellen findet hauptsächlich bei Viruserkrankungen statt, in denen sie die befallenen Körperzellen durch Zytolyse abtöten. NK-Zellen sekretieren in hohem Maße IFN- $\gamma$  und stimulieren die Abtötung phagozytierter Bakterienbestandteile durch Makrophagen.

Die angeborene Immunantwort führt zu einer ersten Reaktion des Körpers auf eine Infektion mit *H. pylori*. Während diese Reaktion bei vielen Erkrankungen ausreichend ist, kommt es hierbei zu keiner effektiven Abwehr des Bakteriums (Prinz et al., 2003). Die adaptive Reaktion des Immunsystems findet zeitlich versetzt erst nach der angeborenen Immunität statt. Diese beiden Arten der Immunantwort sind jedoch nicht streng voneinander getrennt, sondern beeinflussen sich gegenseitig. Durch die Stimulation von Antigen-präsentierenden APZs kommt es zu einer Aktivierung von Lymphozyten und der Entwicklung einer T-Helfer (Th) Antwort. Antigen-spezifische T-Zellen der zellulären Abwehr sekretieren eine Vielzahl an Zytokinen, die in der Lage sind, die Effektorzellen der angeborenen Immunantwort zu stimulieren.

Bei einer Infektion mit *H. pylori* spielen CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen die Hauptrolle bei der Vermittlung der adaptiven Immunabwehr (Nagai et al., 2007). Im Laufe der Infektion werden Bakterien und deren Bestandteile von APZs phagozytiert und auf MHC-II-Molekülen präsentiert. Diese APZs führen zu einer antigenspezifischen Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Prinzipiell können sich diese T-Helfer-Zellen dann durch klonale Expansion in zwei unterschiedliche Klassen aufteilen (Farrar et al., 2002). Th1-Zellen sezernieren IFN- $\gamma$  als Leitzytokin und induzieren eine zellvermittelte Immunität, die beispielsweise bei intrazellulären Parasiten wie *Leishmania* und *Toxoplasma gondii* von Bedeutung ist (Murphy et al., 2002). Im



Gegensatz dazu werden von Th2-Zellen hauptsächlich die Zytokine IL-4 und IL-10 sekretiert. Diese Immunantwort ist mit der humoralen, also der durch Antikörper vermittelten Immunität verknüpft und bietet Schutz z.B. vor intestinalen Helminthen (Murphy et al., 2002). Im Falle von *Helicobacter pylori* konnte die Expression von IL-12 in der Magenschleimhaut nachgewiesen werden (Haeberle et al., 1997). Dieses Zytokin sorgt für eine lokale Th1-Prägung von T-Lymphozyten. Die im Tiermodell gemachte Beobachtung, dass *H. pylori* bevorzugt zu einer Th1-Immunantwort führt, konnte auch durch klinische Ergebnisse bestätigt werden. In Biopsien des Antrums von Patienten mit peptischem Ulkus wurde die Expression von IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF nachgewiesen, nicht jedoch von IL-4 (D'Elis et al., 1997). Diese Th1-dominierte Immunantwort führt jedoch zu keiner erfolgreichen Eradikation von *H. pylori*; die Infektion kann ein Leben lang persistieren. Zudem schädigen diese Th-1 Lymphozyten das Epithel durch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (Ernst et al., 2001). Th1 T-Zellen spielen daher auch eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des peptischen Ulkus.

Die Bedeutung einer Th1- oder Th2-Richtung der Immunantwort konnte im Tiermodell bestätigt werden. Durch die Behandlung von Mäusen mit IFN- $\gamma$  konnte eine Gastritis induziert werden, während die Verabreichung von IL-4 zu einer reduzierten Kolonisierung in chronisch infizierten Mäusen führte (Zavros et al., 2003; Del Giudice et al., 2004). Aber auch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 ist in der Lage, die Ausprägung der Gastritis zu reduzieren (Ismail et al., 2003). Eine erhöhte Expression von IL-12p40, IFN- $\gamma$ , TNF und iNOS führte bei immunisierten Mäusen zu einem Schutz vor *H. pylori*, nicht jedoch Th2-Zytokine wie IL-4 und IL-10, oder auch die Chemokine KC und Mip-2 (Garhart et al., 2003). Eine Th1-gerichtete Immunantwort kann also zu immunpathologischen Schäden führen, während eine Th2-Antwort keinen Schutz bietet (D'Elis et al., 2005). Eine echte Protektion vor *H. pylori* kann nur durch eine spezifische Th1-dominierte Reaktion erfolgen, die jedoch durch Th2 Zellen moduliert wird.

Eine Infektion mit *H. pylori* führt zu einer Th1-gerichteten Immunantwort, die jedoch zu keiner Eradikation des Bakteriums führt. Die Entzündungsreaktion ist durch den Einstrom von Neutrophilen, Makrophagen und Th1-Zellen gekennzeichnet, so wie es beim Ablauf einer intrazellulären Infektion typisch wäre. Allerdings ist *H. pylori* kein intrazellulärer Erreger und die erzeugte Immunantwort führt eher zu epithelialen Zellschäden als zu einer Beseitigung des Bakteriums. An

dieser „falschen“ Immunantwort ist das Bakterium selbst beteiligt. Auf der einen Seite kann *H. pylori* durch Anpassungsmechanismen einer Detektion durch das Immunsystem entgehen. LPS von Gram-negativen Bakterien ist normalerweise sehr immunogen, nicht jedoch das von *H. pylori* (Luo et al., 2004; Yokota et al., 2007). Auch Flagellen stellen in der Regel eine hoch konservierte Struktur dar; das Bakterium schafft es allerdings, eine Detektion durch den dafür typischen Rezeptor TLR5 zu vermeiden (Luo et al., 2004; Sterzenbach et al., 2007; Galkin et al., 2008). Bakterielle DNA enthält methylierte CpG-Motive, die zu einer Aktivierung von TLR9 führen (Cornelie et al., 2004). DNA von *H. pylori* scheint allerdings nur geringe immunstimulatorische Eigenschaften zu besitzen (Takata et al., 2002). *Helicobacter pylori* kann die Immunantwort des Wirts auch direkt beeinflussen. So führt das Zytotoxin VacA zu einer Inhibition der Antigenpräsentation und einer verminderten T-Zell Proliferation (Molinari et al., 1998). Durch CagA kommt es zu einer Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen in Epithelzellen (Segal et al., 1999; Wang et al., 2001a). Die Virulenzfaktoren von *H. pylori* sind also in der Lage, sowohl proinflammatorische als auch immunsuppressive Effekte auszuüben. Möglicherweise induziert das Bakterium als Überlebensstrategie eine chronische Entzündungsreaktion, durch die es nicht beseitigt werden kann. Allerdings werden gleichzeitig schwerwiegendere Formen der Inflammation verhindert, die möglicherweise zu einer Eradikation von *H. pylori* führen könnten.

### **3.1.7 Tiermodelle der Infektion mit *H. pylori***

Eine Infektion von Tieren mit *Helicobacter* spp. kommt natürlicherweise sehr häufig vor. Dabei ist das Vorkommen des Bakteriums nicht nur auf den Magen beschränkt; auch in der Leber kann man sogenannte enterohepatische *Helicobacter* finden (Bohr et al., 2007). Einige *Helicobacter* spp. sind auch in der Lage mehrere Arten zu infizieren, z.B. *H. cinaedi*, der sowohl bei Menschen und Rhesus Affen, als auch Hunden, Hamstern, Ratten und Füchsen nachgewiesen werden konnte (Fernandez et al., 2002; Comunian et al., 2006; Rossi et al., 2007). Das Vorkommen von *Helicobacter* spp. in Vögeln (z.B. *H. pametensis*) zeigt die weite Verbreitung dieser Bakteriengattung (Dewhirst et al., 1994). *Helicobacter pylori* wurde bisher jedoch nur bei Menschen und Primaten nachgewiesen, gefundene Infektionen bei Katzen und Hunden sind mit hoher Wahrscheinlichkeit

Fälle einer umgekehrten Zoonose (Nedrud, 1999). Diese *Helicobacter* Art besitzt die größte klinische Relevanz, obwohl auch andere aus dem Menschen isolierte *Helicobacter* spp. durchaus humanpathogenes Potenzial besitzen. So kann eine Infektion mit *H. heilmannii* eine Gastritis verursachen; oder beispielsweise *H. cinaedi*, der für enterische oder vaskuläre Infektionen verantwortlich gemacht wurde (Solnick, 2003). Eine Infektion von Tieren mit *H. pylori* ist durch die hochentwickelten Anpassungsmechanismen an den Menschen nicht einfach und erfordert neben einem geeigneten Tiermodell auch die Verwendung bestimmter adaptierter Bakterienstämme.

#### **3.1.7.1 Primaten**

Primaten wären das am besten geeignete Tiermodell, da sie als natürliche Wirte für *H. pylori* fungieren, der Infektionsverlauf dem menschlichen am meisten ähnelt und das Immunsystem große Ähnlichkeiten zum menschlichen Immunsystem aufweist (Dubois et al., 1994). Aufgrund der enormen Kosten bei Anschaffung und Haltung, ethischer Bedenken und Problemen mit dem Artenschutz kommen sie allerdings nur in einigen wenigen Ausnahmefällen in Betracht.

#### **3.1.7.2 Gnotobiotische Schweine**

Die Infektion gnotobiotischer Ferkel mit *H. pylori* war das erste beschriebene *H. pylori*-Tiermodell (Krakowka et al., 1987; Lambert et al., 1987). Es war bei der Erforschung putativer bakterieller Virulenzfaktoren, wie z.B. Urease und Flagellen sehr hilfreich (Eaton et al., 1991; Eaton et al., 1994; Eaton et al., 1996). Der große Vorteil dieses Modellsystems liegt in der anatomischen und physiologischen Ähnlichkeit des Magens im Vergleich zum Menschen (Krakowka et al., 1987). Die Pathologie der Infektion ähnelt zwar dem menschlichen Verlauf, es gibt jedoch Unterschiede in Bezug auf die ausgebildete Gastritis und Läsionen des Magens (Engstrand et al., 1990). Außerdem verursacht dieses Modell hohe Kosten sowohl bei der Anschaffung der Tiere als auch bei deren spezieller Unterbringung.

#### **3.1.7.3 Katzen und Hunde**

Die Infektion von Beagle-Welpen mit *H. pylori* wurde zwar erfolgreich durchgeführt, aber trotz typischer histopathologischer Schleimhautveränderungen blieb die Kolonisationsdichte niedrig (Radin et al., 1990).

Experimentelle Infektionen von Katzen mit *H. pylori* wurden beschrieben (Handt et al., 1995; Fox et al., 1995). Die Tiere entwickelten eine Gastritis mit geringer Infiltration von Neutrophilen. Aufgrund hoher Kosten und emotionaler Probleme bei der Verwendung von Haustieren sind auch diese beiden Tiermodelle nur bedingt geeignet.

#### **3.1.7.4 Mäuse**

Bis heute gelang zwar die Infektion von Mäusen mit verschiedenen *H. pylori*-Stämmen, es zeigten sich jedoch kaum histopathologische Schleimhautveränderungen des Magens. Viele *H. pylori*-Stämme sind überhaupt nicht in der Lage, den Mausmagen zu kolonisieren, die Faktoren dafür sind noch unbekannt (Ayraud et al., 2002). Bisher wurden mit diesem Modell intensiv Immunreaktionen auf *H. pylori* und die Möglichkeiten einer Vakkzinierung untersucht; es zeigten sich auch bereits erfolgreiche Ansätze (Czinn et al., 1991; Chen et al., 1992). Mäuse sind aufgrund vorhandener immunologischer Reagenzien, niedriger Anschaffungs- und Unterhaltskosten und einer Vielzahl an Inzucht-Stämmen, transgener oder Knockout-Mäuse ein ideales Tiermodell. Knockout-Mäuse konnten beispielsweise durch Deletionen in regulierenden Zytokinen zur Aufklärung immunologischer Abläufe der *H. pylori*-Infektion beitragen. In IL-10-Knockout-Mäusen wurde aufgrund der fehlenden Gegensteuerung zu proinflammatorischen Abläufen eine schwerwiegendere Gastritis als beim Wildtyp beobachtet (Berg et al., 1998). Aus diesem Grund werden Mäuse auch weiterhin als Tiermodell für die *H. pylori*-Infektion verwendet werden, obwohl sie kein optimales Tiermodell darstellen.

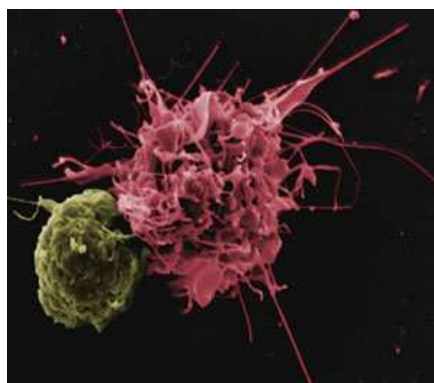
#### **3.1.7.5 Mongolische Wüstenrennmaus (Gerbil)**

Mongolische Gerbils wurden 1991 erstmals mit *H. pylori* infiziert (Yokota et al., 1991). Auf eine Infektion reagierten sie mit einer schweren, aktiv und chronisch destruktiven Gastritis (Ikeno et al., 1999) inklusive Lymphfollikeln und Ulzera (Hirayama et al., 1996b; Matsumoto et al., 1997; Takahashi et al., 1998). Mehr als ein Drittel der Tiere entwickelten Adenokarzinome (Watanabe et al., 1998). In diesem Tiermodell konnte also eine im Vergleich zum Menschen sehr ähnlich ablaufende Magenpathologie beobachtet werden. Gegenüber Mäusen sind die Anschaffungs- und Unterhaltskosten für Gerbils nur unwesentlich erhöht; es fehlen jedoch transgene Tiere und auch kommerzielle Reagenzien für Gerbils sind nur vereinzelt erhältlich. Die anfängliche Euphorie um dieses Tiermodell hat zwar

bereits etwas abgenommen (Otaka et al., 2006), jedoch wird die Mongolische Wüstenrennmaus nach wie vor für das zurzeit am besten geeignete experimentelle Tiermodell für die Infektion mit *H. pylori* angesehen.

### 3.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen stellen einen Teil des Immunsystems von Säugetieren dar und nehmen eine Schlüsselfunktion bei der Aktivierung der Immunantwort ein. Der Name dieser Zellen leitet sich aus ihrer sternförmigen Gestalt ab, die während bestimmter Entwicklungsstadien ausgebildet wird und hat ansonsten nichts mit Nervenzellen zu tun. Das morphologische Aussehen von Dendritischen Zellen wird durch zytoplasmatische Fortsätze bestimmt, die eine Länge von etwa 19µm, in Einzelfällen sogar bis zu 60µm, erreichen können. Dadurch kommt es bis zu einer dreifachen Vergrößerung der Zelloberfläche im Vergleich zu einer sphärischen Zelle, was wiederum mehr Zell-Zell-Kontakte ermöglicht (Miller et al., 2004). Diese Eigenschaft ist essentiell für die Hauptaufgabe von Dendritischen Zellen, nämlich die Präsentation von mikrobiellen Antigenen an ihrer Zelloberfläche zur Erkennung durch Lymphozyten (Banchereau et al., 1998; Rad et al., 2007).



**Abbildung 3: Interaktion einer Dendritischen Zelle (rot) mit einem Lymphozyt (grün)**

Dendritische Zellen sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen, die durch die Interaktion mit T-Zellen zu deren Aktivierung führen und damit eine Reaktion des Immunsystems auf Mikroben auslösen.

(Abbildung: <http://www.bellicum.com/>)

Alle Dendritischen Zellen stammen von Stammzellen des Knochenmarks ab und die meisten, sogenannte myeloide Dendritische Zellen, werden von der

Blutzelllinie der Monozyten abgeleitet (Abbas et al., 2003). Dendritische Zellen sind jedoch die einzigen Blutzellen, die solch eine außergewöhnliche morphologische Gestalt annehmen (Steinman, 1991; Banchereau et al., 1998).

Dendritische Zellen wurden erstmals von Paul Langerhans im späten Neunzehnten Jahrhundert beschrieben und auch nach ihm benannt. Der Begriff „Dendritische Zelle“ wurde 1973 von Steinmann und Cohn zum ersten Mal gebraucht (Steinman et al., 1973). Dabei wurden Zellen mit „verhüllter“ Morphologie (d.h. runde Zellen mit umfangreichen zytoplasmatischen Fortsätzen) durch Licht- und Elektronenmikroskopie in der Milz und peripheren Lymphknoten von Mäusen dargestellt. Diese Zellen konnten später auch in weiteren Organen nachgewiesen werden, z.B. der Haut, sogenannte Langerhans'sche Zellen (Romani et al., 1992), außerdem in Peyer'schen Plaques (Kelsall et al., 1996) und der Leber (Lu et al., 1994).

Die Entwicklung von Dendritischen Zellen beginnt mit einem unreifen (*immature*) Zustand, geht dann in einen reifen (*mature*) über, gelegentlich wird noch ein drittes, apoptotisches Stadium hinzugezählt (Winzler et al., 1997; Banchereau et al., 2000; Underhill et al., 2002). Unreife Dendritische Zellen befinden sich in den Epithelien der Haut, des Gastrointestinaltrakts und der respiratorischen Systeme, da diese Bereiche die Haupteintrittspforten für Erreger darstellen (Abbas et al., 2003). Die Aufgabe von Dendritischen Zellen ist die Aufnahme von Protein-Antigenen und der Transport dieser zu den Lymphknoten. Pathogene werden anhand ihrer konservierten *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) erkannt, z.B. LPS oder Flagellin (Schaefer et al., 2004). Dazu dienen spezielle Rezeptoren, zu denen unter anderen auch die Toll-like Rezeptoren gehören (Elson et al., 2007). Eine Besonderheit von Dendritischen Zellen ist ihre Fähigkeit durch *tight junctions* zu migrieren, wodurch ein Kontakt mit dem gastrointestinalen Lumen ermöglicht wird (Rescigno et al., 2001; Takano et al., 2005).

Nachdem unreife Dendritische Zellen mit Mikroorganismen oder deren Bestandteilen in Kontakt kommen, werden diese durch Phagozytose oder Makropinozytose aufgenommen (Nayak et al., 2006). Nun können Dendritische Zellen einen wichtigen Beitrag zur angeborenen Immunantwort leisten, indem sie beträchtliche Mengen an Interferonen und Zytokinen, wie z.B. IL-12, produzieren. Dendritische Zellen aktivieren auch NK Zellen und natürliche Killer T-Zellen, die die eingedrungenen Erreger sehr schnell vernichten und wichtige Zytokine

sekretieren (Mellman et al., 2001). Zur Einleitung der angeborenen Immunantwort werden die aufgenommenen Antigene in den DCs prozessiert und auf MHC-II-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert; die Dendritischen Zellen wandern währenddessen zu den lymphatischen Organen (Bernstein et al., 2008). Es findet ein Reifungsprozess statt, wodurch die Zellen ihre Fähigkeit zur Phagozytose verlieren, jedoch wird die Fähigkeit zur Präsentation von Antigenen verstärkt (Cochand et al., 1999). Dies geschieht durch den erhöhten Transport von MHC-II-Molekülen an die Zelloberfläche (Baron et al., 2001; Delaguillaumie et al., 2008). Zusätzlich wird die Expression der für T-Zellen kostimulatorisch wirkenden Moleküle wie CD80, CD83 und CD86 gesteigert (Tong et al., 2005; Hayati et al., 2007).

Die Sekretion von Zytokinen durch Dendritische Zellen spielt für den weiteren Verlauf der Immunantwort eine zentrale Rolle. Abhängig vom jeweiligen Stimulus kann hier eine Th1- oder eine Th2-Antwort ausgelöst werden (de Jong et al., 2002; Agrawal et al., 2003). Nur TLR Signale, wie beispielsweise LPS, sind in der Lage die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen einzuleiten. Dazu gehört auch IL-12, welches Th-1 polarisierend wirkt (Wiethe et al., 2008). Dieses Zytokin wird z.B. im frühen Stadium einer bakteriellen Infektion mit *H. pylori* sekretiert (Kranzer et al., 2004; Kranzer et al., 2005). Sobald die Infektion jedoch andauert, scheinen sich die Dendritischen Zellen zu erschöpfen und produzieren unter anderem weniger IL-12 (Mitchell et al., 2007). Durch diese unzureichende Immunantwort wird möglicherweise die chronische Persistenz des Bakteriums ermöglicht. Bei einer Th2-Immunantwort, z.B. einer Infektion durch Helminthen oder auch allergischen Reaktionen, kommt es zu keiner Sekretion von IL-12 (Caron et al., 2001; Cervi et al., 2004). Die Induktion dieser Immunantwort ist wahrscheinlich von den Zytokinen IL-4 und/oder IL-10 abhängig (Kalinski et al., 2000; Zhu et al., 2008).

Durch die Apoptose von Dendritischen Zellen wird auch ein wichtiger Beitrag zur Regulierung von Autoimmuntoleranz geleistet. Ein Defekt hierbei kann zu Autoimmunerkrankungen führen (Chen et al., 2006).

Dendritische Zellen sind verantwortlich für die Regulation der T- und B-Zellantwort, ebenso wie für die Verbindung von angeborener und adaptiver Immunantwort (Craxton et al., 2003; Celli et al., 2008; Hammad et al., 2008). Diese zentrale Stellung von Dendritischen Zellen im Immunsystem rückte in letzter Zeit als

Ansatz für Vakkzinierungsversuche vor allem im Bereich Tumorerkrankungen, aber auch für Infektionskrankheiten in den Fokus des Interesses (Ludewig, 2003; Shu et al., 2007; Palucka et al., 2007; Lehrnbecher et al., 2008; Chu et al., 2008; Fajardo-Moser et al., 2008). Dabei werden Dendritische Zellen *in vitro* in Kultur genommen und ihnen werden Erregerbestandteile oder Tumorproteine zur Phagozytose angeboten. Dieser Vorgang wird „Pulsen“ genannt (Yu et al., 2007; Merrick et al., 2008). Die Entwicklung dieser Impfstoffe befindet sich noch in einer frühen Phase der Entwicklung und bisher ist die Immunogenität der Impfstoffe meist noch nicht ausreichend. Es handelt sich hierbei jedoch um einen sehr vielversprechenden Ansatz (Koido et al., 2007).

### 3.3 Vorarbeiten

Die Untersuchung der immunstimulatorischen Eigenschaften von *H. pylori* stellt einen Schwerpunkt innerhalb der Arbeitsgruppe dar (Kranzer et al., 2004; Deml et al., 2005; Kranzer et al., 2005). In diesem Rahmen wurde das Maus-Splenozytenmodell als Modellsystem für angeborene und erworbene Immunreaktionen etabliert (Deml et al., 2004). Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von naiven, d.h. noch nicht mit dem Antigen in Kontakt gekommenen Splenozyten nach Koinkubation mit *H. pylori* zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- $\gamma$  und IL-6 führte, es wurde jedoch auch die Produktion des regulatorischen Zytokins IL-10 beobachtet. Mithilfe einer Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat konnte eine starke proinflammatorische Immunantwort induziert werden. Es wurde jedoch nur ein geringer Einfluss dieser auf das durch *H. pylori* ausgelöste Entzündungsgeschehen beobachtet, da es bei den verwendeten Mausstämmen wie Balb/c oder C57BL/6 nur zu einer geringen Ausprägung der Gastritis im Magen kommt. Deshalb wurde in der Arbeitsgruppe das Modellsystem der Mongolischen Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*) etabliert, das sich in der Literatur bereits als interessantes Tiermodell für eine Infektion mit *H. pylori* ausgezeichnet hat. Die technische Durchführung von Infektionen und Organentnahmen bei Gerbils und der verwendete adaptierte *H. pylori*-Stamm stammen aus der Arbeit von Dr. Ulrike Thalmaier. Zur Analyse der Immunantwort wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgrund fehlender kommerzieller Reagenzien ein neues Nachweissystem entwickelt. Mithilfe der



verwendeten quantitativen TaqMan®-PCR gelang es, immunologische Parameter direkt am Infektionsort im Magen auszuwerten. Dadurch kann nun ein breites Spektrum an Zytokinen, Chemokinen und Toll-like Rezeptoren abgedeckt und somit ein detailliertes immunologisches Expressionsprofil erstellt werden.

### 3.4 Zielsetzung

Eine Infektion mit *H. pylori* führt zu einer starken Th1-gerichteten Immunantwort, die aber nicht in der Lage ist, das Bakterium zu beseitigen. Es wird angenommen, dass die effektive Eradikation des Bakteriums durch die Beteiligung einer Th2-Immunantwort am Infektionsgeschehen erreicht werden kann. In dieser Arbeit sollte durch die Verabreichung verschiedener immunstimulatorischer Substanzen und Immunisierungsansätze die durch *H. pylori* induzierte proinflammatorische Reaktion des Immunsystems verändert werden. Um die Auswirkungen dieser Immunantwort auf die durch *H. pylori* verursachte Gastritis untersuchen zu können, wurden Gerbils verwendet. Diese Tiere zeigen nach einer Infektion mit *H. pylori* im Gegensatz zu Mäusen starke histopathologische Veränderungen im Magengewebe.

Durch die Verwendung von Oligodeoxynukleotiden (ODNs) konnten in Mäusen immunmodulatorische Effekte beobachtet werden. Bestimmte Sequenzabfolgen ähneln bakteriellen DNA-Motiven, sogenannte CpG-ODNs, und wurden als starke Induktoren einer Th1-gerichteten Immunantwort identifiziert (Sommer et al., 2004). Der Austausch von nur einer Base (G gegen C, also GpG-ODN) führte zu einer gegensätzlichen Wirkung, nämlich einer Inhibition der Aktivierung von Th1-Zellen (Ho et al., 2003). Nun sollte der Effekt dieser beiden ODNs auf eine Infektion mit *H. pylori* im Gerbil untersucht werden. CpG-ODNs sollten also zu einer Verstärkung der Th1-Immunreaktion beitragen, während GpG-ODNs durch ihre regulatorische Funktion diese dämpfen. Dementsprechend wurde also bei Verabreichung von CpGs eine Verstärkung der durch *H. pylori* ausgelösten histologischen Veränderungen im Magengewebe erwartet, durch GpGs hingegen eine Abschwächung. In dieser Arbeit sollte ein genaues Immunprofil mit Antikörperbildung, Histologie und Expressionsprofil des Magens Klarheit über die genaue Wirkungsweise von CpG- und GpG-ODN in der *H. pylori*-Infektion bringen.

Eine Immunisierung kann durch die Verwendung von bestimmten Adjuvanzen eine gezielte Reaktion des Immunsystems auslösen. Cholera-Toxin ist in der Lage eine starke, Th-2 gerichtete Immunantwort zu induzieren. Die Kombination aus *H. pylori*-Lysat, CpG-ODN und CT konnte im Mausmodell sogar eine vor einer Infektion mit *H. pylori* schützende Immunantwort induzieren, die mit einer Immunisierung mit den Einzelkomponenten nicht erreicht wurde (Jiang et al., 2003). Deshalb sollte nun der Effekt der verschiedenen Immunisierungskombinationen auf eine Infektion mit *H. pylori* im Gerbil untersucht werden. Die Kombination aus *H. pylori*-Lysat und CpG sollte dabei zu einer verstärkten Th1-Immunreaktion führen und einer damit einhergehenden verstärkten *H. pylori*-induzierten Gastritis, während Lysat und Cholera-Toxin eine Th2-gerichtete Antwort auslösen und daher einen suppressiven Effekt auch auf die histopathologischen Veränderungen im Magengewebe entfalten sollten. Zur Analyse der Wirkung der verschiedenen Immunisierungskombinationen in der *H. pylori*-Infektion diente in dieser Arbeit ein detailliertes Immunprofil mit Antikörperbildung, Histologie des Magens, Kolonisierungsdichte und Expressionsprofil des Magens. Dabei sollte zusätzlich zum Kurzzeiteinfektionsmodell von vier Wochen durch einen späteren Zeitpunkt nach acht Wochen der Langzeiteffekt auf die durch *H. pylori* induzierten Entzündungsreaktionen untersucht werden.

Dendritische Zellen (DCs) spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort; sie sind allerdings auch die wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen und führen über die Aktivierung von T-Zellen zu einer adaptiven Reaktion des Immunsystems. Sie bestimmen somit am Anfang einer Infektion, in welche Th-Richtung sich die Immunantwort entwickeln wird. Dendritische Zellen können *in vitro* „gepulst“ werden, d.h. nach dem experimentell herbeigeführten Kontakt mit Antigenen kommt es zur Prozessierung und Präsentation dieser an der Zelloberfläche. Durch den Transfer dieser gepulsten Dendritischen Zellen zurück in das Tier lassen sich damit gezielte Immunreaktionen auslösen. Dieses Vorgehen wurde bereits erfolgreich mit Tumorbestandteilen und verschiedenen Infektionserregern durchgeführt. Im Mausmodell einer Candida-Infektion erwies sich das Pulsen von DCs mit Pilz-RNA und ein anschliessender Transfer in das Tier als wirkungsvoll gegen eine Infektion mit Candida (Bacci et al., 2002). Ein Transfer von mit *H. pylori*-Lysat oder *H. pylori*-RNA gepulsten Dendritischen Zellen

könnte also im Gerbil-Tiermodell der *H. pylori*-Infektion zu einer protektiven Immunantwort mit entsprechenden Veränderungen der durch das Bakterium ausgelösten histologischen Veränderungen im Magengewebe führen. Ein detailliertes Immunprofil mit Antikörperbildung, Histologie und Expressionsprofil des Magens sollte in dieser Arbeit Klarheit über die genaue Wirkungsweise der unterschiedlich gepulsten DC-Immunisierungen in der *H. pylori*-Infektion bringen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Versuchsdurchführung

#### 4.1.1 Verwendete Organismen

##### 4.1.1.1 *H. pylori*-Stämme

Bei den hier verwendeten Stämmen handelt es sich um Patientenisolat, die am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg konserviert sind. Der Stamm Ca117 sowie das Gerbil-adaptierte Pendant Ca117G wurde freundlicherweise von Dr. Ulrike Thalmaier zur Verfügung gestellt. Der Stamm Ca117 stammt von einem Patienten mit Magenkarzinom und ist Zytotoxin-positiv. Eine besondere Eigenschaft dieses Stamms ist *in vitro* die Induktion einer hohen IL-8-Sekretion von AGS-Zellen schon bei extrem niedriger MOI (Multiplicity of Infection). Bei Stamm 2802 handelt es sich ursprünglich ebenfalls um ein Patientenisolat, er befindet sich allerdings schon seit langer Zeit in Kultur und dient mittlerweile als Standard-Laborstamm.

##### 4.1.1.2 Versuchstiere und Haltung

Sechs Wochen alte weibliche Crl:MON(Tum) Gerbils wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden gruppenweise zu maximal 3 Tieren pro Käfig in einem Schrank mit von der Umgebung unabhängiger Luftversorgung (ESI Flufrance, Wissous, Frankreich) untergebracht. Sie erhielten V1326 ssniff R-Z, extrudiert, Alleinfutter für Ratten-Zucht (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum.

#### 4.1.2 *Helicobacter pylori*

##### 4.1.2.1 Kultivierung

Die Kultivierung von *H. pylori* erfolgte in Anaerobentöpfen (Schütt, Göttingen, Deutschland) unter mikroaerophilen Bedingungen (80% N<sub>2</sub>, 11% O<sub>2</sub>, 9% CO<sub>2</sub>) bei

36°C. Nach dem Evakuieren des Topfes mit einer Vakuumpumpe (Vacubrand, Wertheim, Deutschland) um 0,6 bar wurde bis zum Druckausgleich *H. pylori*-Gas (5% O<sub>2</sub>, 15% CO<sub>2</sub>, 80% N<sub>2</sub>) eingeleitet. Als Standard-Nährmedien wurden WC-Dent-Agarplatten (Oxoid, Wesel, Deutschland) verwendet. Die beimpften Platten wurden zwei bis drei Tage bebrütet.

#### **4.1.2.2 Präparation von lebendem *H. pylori***

Zwei bis drei Tage alter *H. pylori* wurde mit einem Wattestäbchen von der Platte abgenommen, in eiskaltem PBS eingerührt und mit diesem dreimal gewaschen. Durch das Messen der OD bei 600nm konnte anhand einer zuvor ausplattierten Verdünnungsreihe die Anzahl Bakterien pro ml bestimmt werden.

#### **4.1.2.3 Präparation von *H. pylori*-Lysat**

##### **4.1.2.3.1 Unbearbeitetes *H. pylori* Lysat**

Zur Präparation von *H. pylori*-Lysat wurden zwei Platten zwei bis drei Tage alter Kulturen in 2ml PBS eingerührt. Es wurde die OD bei 600nm gemessen und eine Suspension von 5ml mit OD1 hergestellt. Diese wurde für fünf Minuten mit 4410g bei 4°C zentrifugiert (Rotixa 120R, Hettich, Tuttlingen). Das Pellet wurde in 1ml PBS oder H<sub>2</sub>O resuspendiert und anschließend zwei Minuten mit Ultraschall (Labsonic, B. Braun Biotech, Melsungen, Deutschland) behandelt. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe eines Assays nach Lowry (Bio-Rad, München, Deutschland) bestimmt. Für Stimulationsversuche und Antikörpertiterbestimmungen wurde das Lysat nach der Präparation sofort bei -80°C eingefroren; zur Immunisierung von Mäusen wurde nur frisches Lysat verwendet.

##### **4.1.2.3.2 Formalin-fixiertes *H. pylori* Lysat**

Zur Präparation von Formalin-fixiertem *H. pylori*-Lysat wurden zwei Platten drei Tage alter Kulturen in 1ml PBS eingerührt. Die Suspension wurde für vier Minuten mit 4000g bei 4°C zentrifugiert (Rotixa 120R, Hettich, Tuttlingen). Auf das Pellet wurden 2ml einer 0,5%igen Paraformaldehyd-Lösung über Nacht gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde das Pellet fünf mal jeweils 30 Sekunden mit Ultraschall (Labsonic, B. Braun Biotech, Melsungen, Deutschland) behandelt und

anschließend zehn Minuten mit 4000g bei 4°C zentrifugiert (Rotixa 120R, Hettich, Tuttlingen). Das Lysat wurde steril filtriert, die Proteinkonzentration mithilfe eines Assays nach Lowry (Bio-Rad, München, Deutschland) bestimmt und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

#### **4.1.3 Klonierung von Gerbil Genen**

Die in dieser Arbeit durchgeführten PCR- und Klonierungsmethoden werden im Standardwerk von Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989) detailliert beschrieben. Die Klonierung von Gerbil-Genen war zur Herstellung eines Plasmid-Standards für die quantitative TaqMan® PCR notwendig. Außerdem diente die Sequenz zum Design von Primern und Sonden.

Einzelne Gerbil-Gene waren zu Beginn dieser Arbeit bereits im Datenbanksystem GenBank® registriert. Ein 3'- und 5'-Primer-Pärchen wurde an den Anfang und das Ende des offenen Leserasters, also den kodierenden DNA-Bereich, angepasst (Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland). Die Länge der jeweiligen Primer ergab sich aus der Schmelzpunktbestimmung (ca. 50-60°C). Nach einer erfolgreichen Amplifikation erfolgte eine Auftrennung in einem 1%igen Agarose-Gel und eine Gel-Extraktion mit QIAquick Gel Extraction Kit nach Anleitung des Herstellers (Qiagen, Hilden, Germany). Die Identität des erhaltenen Amplifikations-Produkts wurde mithilfe mehrerer Sequenzierung (Geneart, Regensburg, Deutschland) bestätigt.

Als cDNA Vorlage für die PCR dienten Gerbil Splenozyten, die für 36h mit PMA (Sigma, Schnelldorf, Germany) und Ionomycin (Sigma, Schnelldorf, Germany) stimuliert wurden. Die anschließende Extraktion der RNA geschah mithilfe eines RNeasy Mini Kits und QIAshredders nach Anleitung des Herstellers (Qiagen, Hilden, Germany). Die RNA wurde danach mit dem Reverse Transcriptase Core Kit (Eurogentec, Köln, Germany) in cDNA umgeschrieben. Diese Vorlage in Kombination mit den erstellten Primern lieferte in der Standard-PCR mit Taq Polymerase (ABI, Foster City, USA) nach Anleitung des Herstellers ein Ergebnis, das nach einer Reamplifikation mit denselben Primern und einer weiteren Gel-Aufreinigung in den Vektor pBS (Stratagene, La Jolla, USA) kloniert werden konnte und so als Plasmid-Standard für die TaqMan® PCR diente. Die dabei

erhaltenen Sequenz-Informationen dienten zum Design von Primern und Sonden für die quantitative TaqMan® PCR.

In vielen Fällen waren jedoch keine Sequenzinformationen über Gerbil-Gene verfügbar. Hier wurde dann die PCR-Methode „Cross-species PCR“ angewandt (Mai et al., 1994). Aus den vorhandenen Sequenzinformationen von Maus, Ratte und evtl. Mensch wurde ein Annealing der offenen Leseraster mithilfe der Software BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, USA) erstellt. In konservierten Regionen konnten so Primer gelegt werden, die ein ausreichend langes Fragment für die PCR und anschließende Sequenzierung (Geneart, Regensburg, Deutschland) beinhalteten und damit für die TaqMan® PCR nutzbar waren. Um Basenfehlpaarungen der Primer durch eventuelle Sequenzabweichungen zu unterdrücken wurde die Annealing-Temperatur der PCR stark herunter gesetzt (zum Teil auf bis zu 30°C).

In Einzelfällen konnte jedoch auch durch diese Methode kein Ergebnis erzielt werden. Es fand sich dann im Annealing z.B. nur ein einzelner homologer Bereich oder das Teilstück war zu kurz um für die TaqMan® PCR eingesetzt werden zu können. Hier kam eine kombinierte RACE-PCR zum Einsatz (Gaucher et al., 2001). Mithilfe eines (dT)<sub>17</sub>-Ankerprimers

(5'-GACCACGCGTATCGATGTGCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'), eines

Adaptorprimers (5'-GACCACGCGTATCGATGTGCGAC-3') und dem aus dem Annealing erhaltenen sequenzspezifischen Primer konnten selbst in diesen Fällen verwertbare Sequenzteilabschnitte erhalten werden. Die Identität der anschließend sequenzierten Amplifikations-Produkte konnte nur durch einen Vergleich mit bereits bekannten Sequenzen anderer Tierarten bestimmt werden.

Alle verwendeten bzw. neu generierten cDNA (Teil-)Sequenzen von *Meriones unguiculatus* finden sich im Anhang C.

#### **4.1.4 Charakterisierung von Dendritischen Zellen**

##### **4.1.4.1 Mikroskopie**

$2 \cdot 10^5$  Knochenmarks-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit Dendritenmedium und 10% Zellkulturüberstand GM-CSF exprimierender HEK293T Zellen ausgesät. Am zweiten und fünften Tag wurde die Hälfte des gesamten Zellkulturüberstands

abgenommen und zentrifugiert, die enthaltenen Zellen wurden in frischem Dendritenmedium mit GM-CSF resuspendiert und wieder zur Kultur hinzugefügt. Nach sieben Tagen wurden die Zellen mit einem Leica DMIL (Leica, Solms, Deutschland) analysiert.

#### 4.1.4.2 Endozytose von FITC-Dextran

$2 \cdot 10^6$  Knochenmarks Zellen wurden in Zellkulturschalen mit Dendritenmedium und 10% Zellkulturüberstand GM-CSF exprimierender HEK293T Zellen ausgesät. Am zweiten und fünften Tag wurde die Hälfte des gesamten Zellkulturüberstands abgenommen und zentrifugiert, die enthaltenen Zellen wurden in frischem Dendritenmedium mit GM-CSF resuspendiert und wieder zur Kultur hinzugefügt. Nach sieben Tagen wurden alle Zellen geerntet und zu  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro ml Dendritenmedium mit 10% Zellkulturüberstand GM-CSF exprimierender HEK293T Zellen in 24-Well Platten ausgesät. Über Nacht wurden die Zellen mit PBS (Negativkontrolle),  $10 \mu\text{g/ml}$  LPS aus *E. coli* 055:B5 (Sigma, Schnelldorf, Deutschland) und lebendem *H. pylori* Stamm 2802 mit MOI 1 inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag geerntet und mit  $1 \text{mg/ml}$  FITC-Dextran (Sigma, Schnelldorf, Deutschland) bei  $0^\circ\text{C}$  als Negativkontrolle für unspezifische Adhäsion und bei  $37^\circ\text{C}$  für eine Stunde inkubiert. Die Analyse der durchschnittlichen Fluoreszenz erfolgte mit einem Beckman Coulter EPICS XL MCL (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland).

#### 4.1.4.3 Fluoreszente Färbungen

$2 \cdot 10^6$  Knochenmarks Zellen wurden in Zellkulturschalen mit Dendritenmedium und 10% Zellkulturüberstand GM-CSF exprimierender HEK293T Zellen ausgesät. Am zweiten und fünften Tag wurde die Hälfte des gesamten Zellkulturüberstands abgenommen und zentrifugiert, die enthaltenen Zellen wurden in frischem Dendritenmedium mit GM-CSF resuspendiert und wieder zur Kultur hinzugefügt. Nach sieben Tagen wurden die Dendritischen Zellen geerntet und zu  $3 \cdot 10^5$  Zellen pro Well über Nacht in Chamber Slides (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit oder ohne Zugabe von  $0,3 \mu\text{g}$  LPS aus *E. coli* 055:B5 (Sigma, Schnelldorf, Deutschland) ausgesät.

Zur Darstellung der Phagozytose von GFP-exprimierendem *H. pylori* durch Dendritische Zellen, erfolgte eine Inkubation für zwei Stunden bei MOI 10. Nach



einer Fixierung mit 4% PFA (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 30 Minuten, einer Permeabilisierung mit 0,1% TritonX-100 (Sigma, Schnelldorf, Deutschland) für zwei Minuten und mehreren Waschschritten, wurden die Zellen mit Vectashield Mounting Medium (Vector Lab, Peterborough, UK) zur Fluoreszenzanalyse mit einem Carl Zeiss Axiovert 200M LSM510 META (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) vorbereitet.

Zum Anfärben des Aktin-Zytoskeletts wurden die Zellen mit 4% PFA (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und mit 0,1% TritonX-100 (Sigma, Schnelldorf, Deutschland) permeabilisiert. Dann wurde 4µM FITC-Phalloidin (Sigma, Schnelldorf, Deutschland) für 40 Minuten bei Raumtemperatur zugegeben und die Zellen mit Vectashield Mounting Medium (Vector Lab, Peterborough, UK) zur Fluoreszenzanalyse mit einem Carl Zeiss Axiovert 200M LSM510 META (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) vorbereitet.

#### **4.1.4.4 Quantitative PCR (TaqMan®)**

$2 \cdot 10^6$  Knochenmarks Zellen wurden in Zellkulturschalen mit Dendritenmedium und 10% Zellkulturüberstand GM-CSF exprimierender HEK293T Zellen ausgesät. Am zweiten und fünften Tag wurde die Hälfte des gesamten Zellkulturüberstands abgenommen und zentrifugiert, die enthaltenen Zellen wurden in frischem Dendritenmedium mit GM-CSF resuspendiert und wieder zur Kultur hinzugefügt. Nach sieben Tagen wurden alle Zellen geerntet und zu  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro ml Dendritenmedium mit 10% Zellkulturüberstand GM-CSF exprimierender HEK293T Zellen in 24-Well Platten ausgesät. Die Zellen wurden für acht Stunden mit PBS (Negativkontrolle), 10µg/ml LPS aus *E. coli* 055:B5 (Sigma, Schnelldorf, Deutschland) und lebendem *H. pylori* Stamm 2802 mit MOI 1 inkubiert. Jeweils 4 Wells wurden zur RNA Isolation zusammengefasst.

Die RNA wurde mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) und QIA Shredders (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Sie wurde mit DNase (Sigma, Schnelldorf, Deutschland) behandelt und mit dem Reverse Transcriptase Core Kit (Eurogentec, Köln, Deutschland) revers transkribiert. Zur Durchführung der quantitativen TaqMan® PCR wurden Oligonukleotid Primer (Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland und Eurogentec, Köln, Deutschland) und der qPCR Core Kit (Eurogentec, Köln, Deutschland) benutzt. Die PCR setzte sich zusammen aus einem initialen

Denaturierungsschritt bei 95°C für 10 Minuten, gefolgt von 45 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden und anschließend 1 Minute bei 60°C.

Das Design von Primern und Sonden wurde anhand vorhandener Sequenzinformationen in der Gen Bank mithilfe der Software Primer Express (ABI, Foster City, USA) durchgeführt. Im Falle nicht vorhandener Sequenzen mussten die entsprechenden Gene zuvor kloniert werden (siehe 4.1.3 Klonierung von Gerbil Genen).

#### **4.1.5 Herstellung von gepulsten Dendritischen Zellen**

##### **4.1.5.1 Herstellung und Nachweis von GM-CSF-haltigem Zellkulturüberstand**

HEK293T Zellen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) wurden in DMEM Medium mit 10% hitze-inaktiviertem FKS und 1% Penicillin/Streptomycin ausgesät. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 70% mit 30µg Plasmid DNA transfiziert: pQCXIP (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit integriertem GM-CSF. Als Transfektionsmethode wurde Calciumphosphat Präzipitation verwendet. Nach sechs Stunden wurde das Medium gewechselt (RPML, 10%FKS) und die Zellen konnten für weitere 48 Stunden wachsen. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen, steril filtriert und bis zur kurzfristigen Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Der Nachweis von GM-CSF im Zellkulturüberstand erfolgte mithilfe eines Western Blots. Dazu wurde an den C-Terminus des Gens ein 6xHis Tag hinzu kloniert. SDS-PAGE, Blot Transfer und Nachweis mit dem RGS-His HRP Conjugate (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

##### **4.1.5.2 Differenzierung von Dendritischen Zellen**

Die Ausdifferenzierung von Gerbil Knochenmark zu Dendritischen Zellen erfolgte nach einer leicht veränderten Methode von Lutz et. al. (Lutz et al., 1999). Die Oberschenkel- und Unterschenkelknochen von Gerbils wurden möglichst steril entnommen. In der Sterilbank wurde das Knochenmark durch ein 70µm Zellsieb von Knochensplittern gereingt und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden zu  $2 \cdot 10^6$ /ml in Zellkulturflaschen ausgesät und mit 10% GM-CSF-haltigem Zellkulturüberstand inkubiert. Nach jeweils zwei bis drei Tagen wurde die Hälfte

des Dendritenmediums mitsamt GM-CSF erneuert. Alle Zellen wurden nach sieben Tagen geerntet, ausgezählt und sofort zur weiteren Verwendung benutzt.

#### **4.1.5.3 Pulsen von Dendritischen Zellen**

Je  $2 \cdot 10^7$  Zellen wurden mit 200µg *H. pylori* Formalin-Lysat für 24h oder einer DOTAP/*H. pylori*-RNA Mischung für 2h inkubiert. Dazu wurde zuerst RNA aus *H. pylori* mithilfe von QIAzol und des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Der DNase-Verdau erfolgte auf der Säule (Qiagen, Hilden, Deutschland). Je 200µg DOTAP (Roche, Mannheim, Deutschland) und 100µg *H. pylori* RNA wurden für 20Min bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend für 2h auf die Dendritischen Zellen gegeben. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, für weitere 24h inkubiert und danach geerntet.

#### **4.1.6 Tierexperimentelle Verfahren**

##### **4.1.6.1 Adaption von *H. pylori* an Gerbils**

Das Patientenisolat Ca117 musste zuerst an die Mongolische Wüstenrennmaus adaptiert werden. Dazu wurden die Tiere intragastral infiziert, die Mägen nach zwei bis vier Wochen entnommen und auf WC Maus Platten ausgebracht. Im Falle einer erfolgreichen Reisolation wurde der Gerbil-adaptierte Stamm in Kultur genommen und für die weitere Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  e eingefroren.

##### **4.1.6.2 Infektion**

Die Infektion der Tiere erfolgte mit dem Gerbil-adaptierten *H. pylori*-Stamm Ca117G. Dazu wurden mehrere Platten 2-3 Tage alter *H. pylori* in Brucella-Bouillon (BB) eingerührt. Mithilfe einer Analbeutelkanüle (Hauptner, Solingen, Deutschland) wurden jedem Gerbil intragastral  $1 \cdot 10^9$  bis  $1 \cdot 10^{10}$  KBE verabreicht. Die Keimzahlbestimmung erfolgte durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungsstufen. Die Infektionen wurden drei- oder viermal im Abstand von zwei bis drei Tagen durchgeführt.

#### **4.1.6.3 Intraperitoneale Injektion von CpG- bzw. GpG- Oligodeoxynukleotiden**

Die beiden synthetischen Oligodeoxynukleotide (ODNs)

**CpG-ODN** (5'-TGA<sup>T</sup>CTGTGAAC<sup>G</sup>TTAGAGATGA-3') und

**GpG-ODN** (5'-TGA<sup>T</sup>CTGTGAAG<sup>G</sup>TTAGAGATGA-3') wurden von Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen. Zur Verbesserung der *in vivo*-Stabilität wies das Rückgrat der beiden Oligos eine Modifikation mit Phosphorothioat auf. Dadurch wird die Resistenz gegen Nukleasen erhöht. Außerdem wird das ODN gegen Degradation stabilisiert und die Aufnahme durch Zellen gefördert (Krieg, 2002). Das einzelsträngige, lyophilisierte ODN wurde in sterilem Wasser resuspendiert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

#### **4.1.6.4 Intranasale Verabreichung von *H. pylori*-Lysat mit CpG-ODN und/oder Cholera-Toxin**

Zur intranasalen Verabreichung von Lysat mit CpG-ODN und/oder Cholera-Toxin (Sigma, Schnelldorf, Deutschland) wurden die Gerbils in eine kurze Inhalationsnarkose mit Enfluran (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) versetzt. In dieser Zeit wurde den Tieren 10µg unbearbeitetes Ca117G-Lysat, 10µg CpG-ODN und/oder 1µg Cholera-Toxin jeweils in beide Nasenlöcher mit einer Pipette verabreicht. Die Gerbils kamen kurz danach wieder zu Bewusstsein.

#### **4.1.6.5 Intraperitoneale Injektion von gepulsten Dendritischen Zellen**

Die intraperitoneale Injektion von  $2 \cdot 10^6$  gepulsten Dendritischen Zellen pro Tier erfolgte zwei Mal im Abstand von einer Woche.

#### **4.1.6.6 Immunisierung in die Schwanzwurzel**

Zur Analyse der *in vitro* Restimulierbarkeit von T-Zellen durch Dendritische Zellen wurde Gerbils je 200µg unbearbeitetes Ca117G-Lysat in die Schwanzwurzel injiziert. Diese Methode erforderte eine vorhergehende Kurzzeitbetäubung mit einer Kombination aus Ketamin (Inreasa, Freiburg, Deutschland) und Vetranquil (Bayer, Leverkusen, Deutschland).

#### **4.1.6.7 Blut- und Organentnahme**

Zum Zeitpunkt der Organentnahme erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion mit 0,1ml Narcoren (Wirkstoff: Pentobarbital-Natrium, Merial GmbH,

Hallbergmoos, Deutschland). Nach dem Aussetzen der Atmung wurde zuerst die Haut und dann das Peritoneum eröffnet. Durch die freiliegende Bauchhöhle konnte der Thorax durch das Entfernen des Sternums und eines Großteils der Rippen freigelegt werden. Aus dem Herz wurde mit einer 2ml Spritze Blut entnommen. Der Magen wurde an Oesophagus und Übergang zum Duodenum durchtrennt und entlang der großen Kurvatur geöffnet. Reste vom Mageninhalt und Haare wurden mit PBS abgespült. Ein etwa 0,2cm breiter Längsstreifen wurde zur histologischen Beurteilung in eine Einbettkassette eingelegt, ein weiterer Streifen zur späteren RNA-Isolation in RNA Later (Qiagen, Hilden, Germany) eingelegt und ein Streifen zum *H. pylori*-Nachweis durch Nested-PCR verwendet. Der Rest des Magens wurde bei durchgeführtem Anzuchtversuch in *Portagerm pylori* (Bio-Merieux, Nürtingen, Deutschland) überführt.

#### **4.1.7 Serumgewinnung**

Zur Gewinnung von Serum wurde das Blut für einige Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit 1000g abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415R, Wessling-Berzdorf, Deutschland). Das Serum wurde vorsichtig abgenommen und bis zur Bestimmung der Antikörpertiter bei -20°C gelagert.

#### **4.1.8 Splenozytenpräparation**

Die Milzen wurden möglichst steril entnommen, mit dem Stempel einer 5ml Spritze auf einem 70µm Nylonfilter (BD, Heidelberg, Deutschland) zerrieben und mit 5ml Splenozytenmedium pro Milz aufgenommen. Die Zellen wurden 5min bei RT mit 260g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Wessling-Berzdorf, Deutschland). Danach wurden sie in 5ml ACK-RBC Hämolysepuffer (siehe 4.4 Puffer und Lösungen) pro Milz resuspendiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie wie vorher beschrieben pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 5ml Splenozytenmedium pro Milz resuspendiert und anschließend nochmals zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt und die Zellen schließlich in 4ml Splenozytenmedium pro Milz aufgenommen. Die Zellen wurden mit einer Neubauer improved-

Zählkammer (VWR, Nürnberg, Deutschland) ausgezählt und auf eine Zellzahl von  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro ml eingestellt.

#### 4.1.9 Nachweis von *H. pylori* durch Nested-PCR

Die Magenproben für die PCR wurden bis zur Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Der Nachweis von *H. pylori* erfolgte durch eine Nested-PCR im LightCycler® (Roche Diagnostics, Mannheim). Um einen charakteristischen Bereich innerhalb des Urease A-Gens nachzuweisen, wurden die in Tabelle 1 abgebildeten Primer-Pärchen HP-1 und HP-2 als äußere Primer, als innere Primer HP-3 und HP-4 eingesetzt (Bulajic et al., 2002). Alle Reaktionen erfolgten unter standardisierten Amplifikationsbedingungen (siehe LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes Booklet, Roche Diagnostics). Die Extraktion der DNA mit dem DNeasy Tissue Kit von Qiagen (Hilden) sowie die PCR's wurden zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen freundlicherweise von der PCR-Abteilung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt.

Äußere Primer (Amplicons 361-780 in GenBank X17079)		Größe (bp)
HP-1	5'-GCC AAT GGT AAA TTA GTT-3'	
HP-2	5'-CTC CTT AAT TGT TTTTAC-3'	420
Innere Primer (Amplicons 459-655 in GenBank X17079)		
HP-3	5'-GGC GAC AGA CCG GTT CAA ATC GG-3'	
HP-4	5'-GCG TTA AAT CCA AAG ATT CT-3'	197

Tabelle 1: Verwendete Primer zum Nachweis des *H. pylori* Urease-Gens

#### **4.1.10 Histologie**

Die in Einbettkassetten fixierten Magenstreifen wurden für den Transport sofort in ein vierprozentiges Formalinbad eingelegt. In einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte die Entwässerung der Proben, nach Überführung in Xylol wurden sie in Paraffin eingebettet und schließlich mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Entwässern, Schneiden und Färben wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt. Die Aufnahmen der Fotos erfolgten mit einem LEICA DMLB (Olympus, Hamburg, Deutschland) in 100- und 200facher Vergrößerung.

#### **4.1.11 Reisolation von *H. pylori* zur Feststellung der Kolonisierungsdichte im Magen**

Zur Feststellung der Kolonisierungsdichte wurde der restliche Magen aus dem Portagerm *pylori* in PBS überführt. Dort wurde er mithilfe eines Pistills (Roth, Karlsruhe, Deutschland) homogenisiert und je 100µl unverdünnt und in einer 1:10 Verdünnung auf Reisolationsplatten ausplattiert. Diese Reisolationsplatten enthielten eine spezielle Antibiotikamischung (siehe 4.4 Puffer und Lösungen) zur Unterdrückung der Normalflora des Magens und wurden drei bis acht Tage inkubiert. Da ein einzelnes Auszählen der Kolonien nicht möglich war, wurde die Koloniebildung in Kategorien eingeteilt.

- 0: Keine Kolonien
- 1: Vereinzelttes Wachstum
- 2: Zahlreiche Kolonien
- 3: Bakterienrasen

#### **4.1.12 Bestimmung des isotypenspezifischen Antikörpertiters**

Mittelstark bindende ELISA-Platten mit F-Form wurden mit 2µg/ml *H. pylori*-Lysat des Stamms Ca117G in Carbonatpuffer beschickt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer (PBS, 0,05% Tween-20) gewaschen und 1h bei 37°C mit Blocklösung (PBS, 3% FKS, 2% Tween-20) inkubiert. Anschließend wurden die zuvor eingefrorenen Gerbil-Sera verdünnt in Blocklösung aufgebracht und 2h bei 37°C inkubiert. Nach fünf weiteren Waschschritten wurde der Antikörper HRP konjugiertes Hase Anti-Gerbil IgG h+I

(ICL, Newberg, USA) in einer 1:2000 Verdünnung in Blocklösung zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert.

Nach fünf weiteren Waschschritten erfolgte durch Zugabe des Enzymsubstrats o-Phenyldiamin (PharMingen, San Diego, USA) die Farbreaktion. Nach 12 Minuten wurde diese durch Zugabe von 1M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450nm mit einem ELISA Reader (Bio-Rad, München, Deutschland) bestimmt.

#### **4.1.13 Quantitative PCR**

Die Isolation von RNA erfolgte nach Anleitung des Herstellers mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) und QIA Shredders (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die erhaltene RNA wurde mit DNase (Sigma, Schnelldorf, Deutschland) behandelt und revers transkribiert mit Reverse Transcriptase Core Kit (Eurogentec, Köln, Deutschland). Zur Durchführung der quantitativen TaqMan® PCR wurden Oligonukleotid Primer und speziell markierte Sonden verwendet (Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland und Eurogentec, Köln, Deutschland). Die Sonden waren 5' mit dem Fluoreszenzmarker FAM (6-Carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit dem Quencher TAMRA (6-Carboxytetramethyl-Rhodamin) markiert. Der PCR-Ansatz wurde mit dem qPCR Core Kit (Eurogentec, Köln, Deutschland) angesetzt. Die PCR bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 10 Minuten gefolgt von 45 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden und anschließend 1 Minute bei 60°C.

Um eine quantitative Auswertung zu ermöglichen, wurde die Expression des gesuchten Gens anhand eines klonierten Plasmid-Standards kalibriert. Dieser wurde zuvor durch Messung der optischen Dichte auf eine bestimmte Anzahl DNA-Kopien/ml eingestellt. Danach wurden alle Magen-Proben anhand des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) normalisiert. Für Zellkulturversuche galt das nicht, da hier bereits eine definierte Zellzahl eingesetzt wurde.

Das Design vom Primern und Sonden wurde anhand vorhandener Sequenzinformationen in der Gen Bank mithilfe der Software Primer Express (ABI, Foster City, USA) durchgeführt. Im Falle nicht vorhandener Sequenzen mussten



die entsprechenden Gene erst kloniert werden (siehe: 4.1.3 Klonierung von Gerbil Genen).

	<b>TaqMan® Primer 5'</b> <b>TaqMan® Primer 3'</b>	<b>TaqMan® Sonde</b> <b>(5' FAM, 3' TAMRA)</b>
CD11c	TCTGTGGACATGGATGGAGATG GGGTCTGCCCCGTAGTAATGG	CACTGACCTGGTCCTGATCGGT
CD14	AGGACTGATCTCCGCTCTCTGT GCGTTGCGCAGTGCTAAAA	CCAACAAGTTTCCGGCACTCCA
CD80	CGCCTCTCAGGCTCATTCAT CCAATACCTGAAGACATTGAAAGA	TCTTTGTGCTGCTGGTTGCT
CD83	AAGCCTGGACTCAAATACTGCAT ACCCGCTCGCAGGAAAG	TTGTCCAGGCACACTCGCTCA
CD86	TCCCAGACGCATCATGGAA GCGCCTGAGAGCGTGAAG	TGGAATCCTTCTGCTAGTGACG
HPRT	CCCAAAATGGTTAAGGTTGCA AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA	CTTGCTGGTGAAAAGGACCCCTCGA
IFN- $\gamma$	GCCATCTGTCACCCAGAGTCA TTGCCACCTCCGAAGCA	CCTAAGGAAGCGGAAAAGGAGTCGGTG
IL-1 $\beta$	AGATCTCCCAGCAGCATTTCA CTTCTCCACAGCCACGATGA	CAAGAGCTTCCGGCAGGTGGTATCG
IL-4	CAGGGTGCTCCGCAAATTT GACCCCGGAGTTGTTCTTCA	ACTTCCCACGAGAGGTGACTCCATGC
IL-6	GGATCCAGGTCAAATAGTCTTTCC TCCGTCTGTGACTCCAGTTTCTC	ACCCAACTTCCGAGGCGCTCCTAC
IL-10	GCCCAGCAGAGGCGAGTAC GCATGTGGGTCTGGCTGACT	CCGGAATGAGAGTAACTGCACCCA
IL-12p35	AGCTGATGCAGGCTCTGAATC GGTCTCTTTCTGCCAGGTAAGG	TAATGGGCAGACTGTGCCCCGG
IL-12p40	CCTGAAATGTGAGGCAGCAA TCCTTTCCACCAGCCAAGAG	TTACTCCGGGCGTTTCACGT
IL-18	CCTGAAGATAATGGAGACCTGGAA TTTCGTATCACCGTGGCTGTAG	CAGACAGCTTTGGCAGGCTTAGC
iNOS	TCTTGGTGAAAGTGGTGCTCTTT GACCCGGAAGCCATGA	CTTCCGTGCTGATGCGCAAG
KC	AGAGCATCCAGAGCTTGAAGGT CCATTCTTGAGAGTGGCTATGACTT	ACGCCTCCAGGACCCCACTGC

MIF	GATCGCCTGCGCATCAG CGTTGGCTGCGTTCATGTC	CCGGACCGGATCTACATCAACTATT
Mip-2	CACTCTCAAGAACGGTCAGGAA GGATCTTTCGGATGATTTTCTGAA	TCTGTCTCAACCCCGAAAGCCC
TNF	GGTGATTGGCCCCAAAGG GGCCATGGAGCTGATGATG	AAGAGAAGTTCCCAAACGGCCTCC
TLR2	CGTTTTGCTGGAGCCCATAG CATTATCTTGCGCAGTTTGCA	AAGAAAGCCATCCCCCAGCGCTT
TLR4	TGGTGAATGCTGAACAAATGAAA CATGTAGCATTCTAAATCCAACA	TGCAACACCTATAGACCTGAAGGACTCCCTG
TLR5	GGTGCCTGGAAGCCTTCAG CCACCACGATGAGTACAGTCTTG	TACGCCCAGAGCCGGTGTCTGTC
TLR9	GCATCTGAACCTCAAATGGAAC TGTGGCAAGGGAAGTGCAT	CCTCCCATCGGCCTCAGCCC

Tabelle 2: TaqMan® Primer und Sonden

## 4.2 Statistische Auswertung

Alle Resultate wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests unter Verwendung des SPSS Software-Pakets (SPSS Inc., Chicago, USA) auf statistische Signifikanz überprüft.

## 4.3 Verwendete Software

Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm GeneRunner v3.05 (Hastings Software) bearbeitet und ausgewertet. Die Durchführung von *Multiple Sequence Alignments* erfolgte mit BioEdit (programmiert von Tom Hall).

Die Auswertung von ELISA-Daten erfolgte mit Excel (Microsoft Corp., Unterschleißheim, Deutschland).

Betrachtung und Bearbeitung von konfokalen Fluoreszenzaufnahmen wurden mit Zeiss LSM Image Browser v3.2.0.115 durchgeführt.

Das Design von TaqMan® Primern und Sonden erfolgte mit der Software Primer Express® (ABI, Foster City, USA). Die Auswertung der TaqMan®-PCR wurde mit ABI Prism 7000 SDS Software (ABI, Foster City, USA) durchgeführt.

Die Überprüfung der statistischen Signifikanz der experimentellen Ergebnisse erfolgte mit dem SPSS Software-Paket (SPSS Inc., Chicago, USA).

Die graphische Darstellung der experimentellen Daten wurde mithilfe von SigmaPlot 8.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

Die Präsentation von Fotos erfolgte mit Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc., München, Deutschland). Abbildungen wurden mithilfe von CorelDraw v12.0 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) erstellt.

#### 4.4 Puffer und Lösungen

ACK-RBC Hämolysepuffer	150mM $\text{NH}_4\text{Cl}$ 1mM $\text{KHCO}_3$ 0,1mM EDTA pH 7,2 – 7,4
BB	Brucella-Bouillon (Difco, Augsburg, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers
BB-FKS	Brucella-Bouillon (BB) 8% Fötales Kälberserum FKS (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland)
Carbonatpuffer	0,1M Carbonat Coating-Puffer nach Anleitung (Pharmingen, San Diego, USA) 8,40g $\text{NaHCO}_3$ 3,56g $\text{Na}_2\text{CO}_3$ pH 9,5 ad 1000ml $\text{H}_2\text{O}$
Dendritenmedium	RPMI (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) 5% FKS 1% Pen/Strep
Dent	Helicobacter Selektiv-Supplement (Oxoid, Wesel, Deutschland) 5mg Vancomycin 2,5mg Trimethoprim 2,5mg Cefsulodin

	2,5mg Amphotericin B ad 500ml Medium
Einfriermedium für <i>H. pylori</i>	90% Fötales Kälberserum FKS 10% Glycerin
FKS	Fötales Kälberserum (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) 30min bei 56°C hitzeinaktiviert
HEK293T Zellen Medium	DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) 10% FKS (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) 1% Pen/Strep
PBS	80g NaCl 2g KCl 14,2g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,7g CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 1,3g MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O ad 1000ml H <sub>2</sub> O pH 7,0 – 7,7
Penicillin/Streptomycin	PAN, Aidenbach, Deutschland
Reisolation	125mg Vancomycin 5mg Polymixin 62,5mg Trimethoprim 12,5mg Amphotericin B 100mg Bacitracin ad 500ml Medium
Splenozytenmedium	RPML 1640 (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) 5% FKS (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) 20mM HEPES
WC-Dent	Wilkins-Chalgren-Agar (Oxoid, Basingstoke, England) nach Anleitung des Herstellers 0,4g KNO <sub>3</sub> 10% lysiertes Pferdeblut ad 1000ml H <sub>2</sub> O

WC-Maus	WC-Agar mit 125mg Vancomycin 5mg Polymixin 62,5mg Trimethoprim 12,5mg Amphotericin B 100mg Bacitracin ad 500ml Medium
---------	---

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Lösungen und Nährböden

## 4.5 Reagenzien und Material

### 4.5.1 Reagenzien

Es wurden laborübliche Chemikalien von Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) in p. a. Qualität verwendet.

### 4.5.2 Material

Kanülen, Spritzen	Becton Dickinson (BD) Falcon, Heidelberg, Deutschland
70µm Zellsieb	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
0,2µm Sterilfilter	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturschalen und Flaschen für Zellkultur	BD, Falcon, Heidelberg, Deutschland
96-Well-ELISA-Platte F-Form, mittlere Bindungskapazität	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Einbettkassetten	Kabe Labortechnik, Nürnberg-Elsenroth, Deutschland
Neubauer improved- Zählkammer	VWR, Nürnberg, Deutschland

Tabelle 4: Verwendetes Material

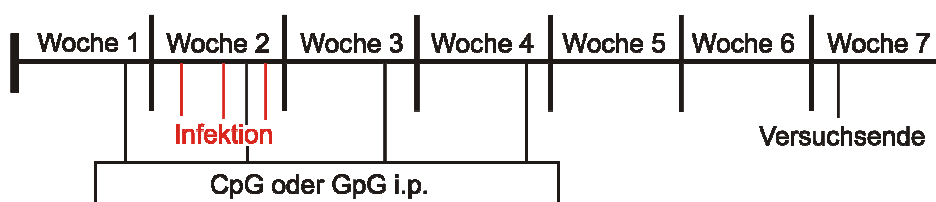
## 4.6 Versuchsaufbau

### 4.6.1 Modulation der *H. pylori*-induzierten Immunantwort durch Injektion von immunstimulatorischen CpG- oder GpG-Oligodeoxynukleotiden

Insgesamt 36 Gerbils wurden zu 4 Gruppen aufgeteilt:

- (1) BB + PBS i.p.
- (2) Infektion mit Hp Stamm Ca117G + PBS i.p.
- (3) Infektion mit HP Stamm Ca117G + CpG i.p.
- (4) Infektion mit Hp Stamm Ca117G + GpG i.p.

Der ersten Gruppe wurde eine intraperitoneale Injektion mit PBS verabreicht und intragastral Brucella-Buillon (BB). Diese Tiere dienten als Kontrollgruppe, sowohl für die Infektion mit *H. pylori* als auch für die Injektion von Oligodeoxynukleotiden (ODN). Die zweite Gruppe erhielt ebenfalls eine Injektion mit PBS, diesmal wurden die Tiere allerdings mit dem Gerbil-adaptierten *H. pylori* Stamm Ca117G infiziert. Der dritten Gruppe wurde eine intraperitoneale Injektion mit jeweils 50µg CpG-ODN verabreicht, auch diese Tiere wurden infiziert. Der vierten und letzten Gruppe wurde das suppressive GpG-ODN injiziert, welches sich nur in einer Base zum CpG-ODN unterscheidet. Diese Gerbils wurden ebenfalls mit *H.pylori* infiziert. Der zeitliche Ablauf gestaltete sich wie folgt:



Die intraperitonealen Injektionen der ODNs wurden über einen Zeitraum von vier Wochen wöchentlich verabreicht. Dazwischen erfolgte die Infektion der Tiere mit dem Gerbil-adaptierten *H. pylori* Stamm Ca117G. Das Experiment wurde nach vier Wochen Infektionsdauer beendet und drei Mal zu unterschiedlichen Zeitpunkten und voneinander unabhängig durchgeführt.

#### 4.6.2 Modulation der *H. pylori*-induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen

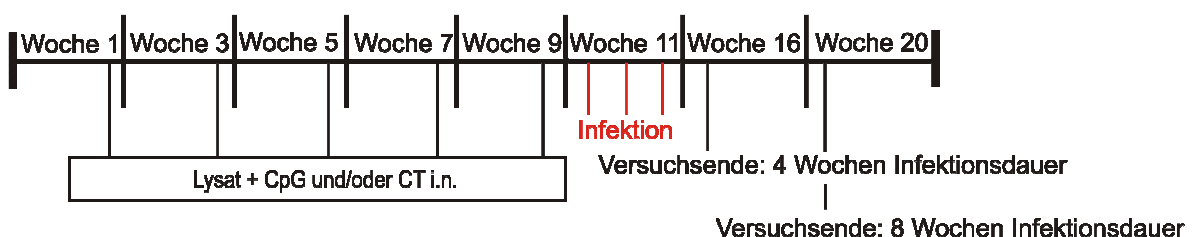
Insgesamt 48 Tiere wurden zu Beginn in 2 Großgruppen aufgeteilt: Eine Hälfte der Tiere wurde der *H. pylori* Infektion für vier Wochen ausgesetzt, die andere acht Wochen.

Innerhalb dieser Aufteilung wurden fünf verschiedene Gruppen zusammengestellt:

- (1) BB + PBS i.n.
- (2) Infektion mit Hp Stamm Ca117G + PBS i.n.
- (3) Infektion mit Hp Stamm Ca117G + Lysat/CpG i.n.
- (4) Infektion mit Hp Stamm Ca117G + Lysat/CT i.n.
- (5) Infektion mit Hp Stamm Ca117G + Lysat/CpG/CT i.n.

Der ersten Gruppe wurde PBS intranasal verabreicht und intragastral Brucella-Buillon (BB). Diese Tiere dienten als Kontrollgruppe, sowohl für die Infektion mit *H. pylori* als auch für die Verabreichung der verschiedenen Immunisierungsstrategien. Die zweite Gruppe erhielt ebenfalls PBS intranasal, diesmal wurden die Tiere allerdings mit dem Gerbil-adaptierten *H. pylori* Stamm Ca117G infiziert. Der dritten Gruppe wurde intranasal eine Kombination aus 10µg *H. pylori* Lysat und 10µg CpG-ODNs verabreicht, auch diese Tiere wurden infiziert. Die vierte Gruppe erhielt eine ähnliche Zusammenstellung wie Gruppe 3, nur wurde das zuvor verwendete CpG-ODN durch 1µg Cholera-Toxin ersetzt. Der fünften und letzten Gruppe wurde intranasal eine Kombination aus *H. pylori* Lysat, CpG-ODNs und Cholera-Toxin verabreicht. Diese Gerbils wurden ebenfalls mit *H. pylori* infiziert.

Der zeitliche Ablauf gestaltete sich wie folgt:



Die intranasale Verabreichung der Immunisierung wurde über einen Zeitraum von fünf Wochen wöchentlich durchgeführt. Danach erfolgte die Infektion der Tiere mit dem Gerbil-adaptierten *H. pylori* Stamm Ca117G. Der Versuch wurde jeweils nach

vier und acht Wochen Wochen Infektionsdauer beendet und für diese beiden Zeitpunkte jeweils zwei Mal zu unterschiedlichen Zeitpunkten und voneinander unabhängig durchgeführt.

#### 4.6.3 Modulation der *H. pylori*-induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit gepulsten Dendritischen Zellen

Insgesamt 30 Gerbils wurden zu 5 Gruppen mit jeweils 6 Tieren aufgeteilt:

- (1) BB + PBS i.p.
- (2) BB + DCs i.p.
- (3) Infektion mit Hp Stamm Ca117G + DCs i.p.
- (4) Infektion mit Hp Stamm Ca117G + DCs Lysat i.p.
- (5) Infektion mit Hp Stamm Ca117G + DCs RNA i.p.

Der ersten Gruppe wurde eine intraperitoneale Injektion mit PBS verabreicht und intragastral Brucella-Buillon (BB). Diese Tiere dienten als Kontrollgruppe, sowohl für die Infektion mit *H. pylori* als auch für die Injektion von Dendritischen Zellen. Die zweite Gruppe erhielt eine intraperitoneale Injektion von  $2 \cdot 10^6$  ungepulsten Dendritischen Zellen pro Gerbil, die Tiere wurden nicht infiziert. Der dritten Gruppe wurde ebenfalls eine intraperitoneale Injektion mit ungepulsten Dendritischen Zellen verabreicht, diese Tiere wurden allerdings zusätzlich mit dem Gerbil-adaptierten *H. pylori* Stamm Ca117G infiziert. Die vierte Gruppe erhielt eine Injektion mit Dendritischen Zellen, die zuvor *in vitro* mit Formalin-fixiertem *H. pylori* Lysat gepulst wurden. Auch diese Tiere wurden infiziert. Der fünften und letzten Gruppe wurde eine intraperitoneale Injektion mit Dendritischen Zellen verabreicht, die zuvor *in vitro* mit RNA aus *H. pylori* gepulst wurden. Diese Gerbils wurden ebenfalls mit *H. pylori* infiziert.

Der zeitliche Ablauf gestaltete sich wie folgt:





---

Die intraperitoneale Verabreichung der Dendritischen Zellen erfolgte zweimal im Abstand von einer Woche. Danach wurden die Tiere mit dem Gerbil-adaptierten *H. pylori* Stamm Ca117G infiziert. Der Versuch wurde nach vier Wochen Infektionsdauer beendet und zwei Mal zu unterschiedlichen Zeitpunkten und voneinander unabhängig durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Klonierung von Gerbil-Genen und Etablierung einer immunologischen Analyseverfahren durch quantitative PCR

Zur umfassenden Analyse immunologisch wichtiger Parameter von *Meriones unguiculatus* (Mongolische Wüstenrennmaus) sollten verschiedene Faktoren untersucht werden, darunter vor allem Zytokine, aber auch Chemokine, Toll-like Rezeptoren und Oberflächenmoleküle von Dendritischen Zellen. Da die Untersuchung der Immunparameter möglichst am Ort der Infektion mit *H. pylori* erfolgen sollte, also im Magengewebe, wurde die quantitative PCR als Analyseverfahren gewählt. Dazu sind jedoch spezifische DNA-Sequenzinformationen nötig, die zum Zeitpunkt dieser Arbeit für Gerbils nur vereinzelt vorhanden waren.

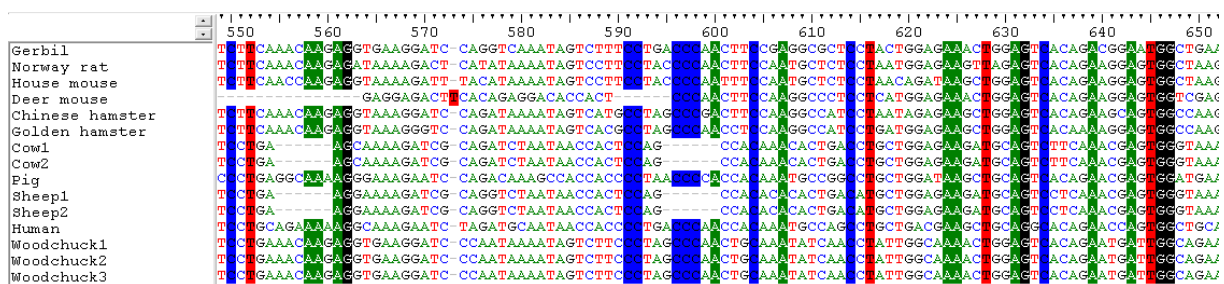
#### 5.1.1 Klonierung bereits veröffentlichter Gerbil-Sequenzen

Vereinzelte Gerbil-Sequenzen waren bereits im Datenbanksystem GenBank® veröffentlicht, z.B. IFN- $\gamma$  und HPRT. Anhand dieser Informationen konnte umgehend ein 3'- und 5'-Primer-Pärchen angesetzt werden, das den kodierenden Bereich des Gens umfasste. Hierbei kam es immer zu einer sehr spezifischen Amplifikation, in manchen Fällen konnte aber mithilfe einer Sequenzierung für einzelne Basen eine Abweichung der veröffentlichten Information mit den erhaltenen Sequenzen festgestellt werden. Diese Unterschiede sind mit den Besonderheiten der verwendeten Gerbils erklärbar, da es sich um genetisch variable Auszucht-Tiere handelt.

#### 5.1.2 Klonierung von Gerbil-Sequenzen mithilfe veröffentlichter Sequenzinformationen anderer Tierarten

In vielen Fällen waren keine spezifischen Gerbil-Sequenzen verfügbar, meist allerdings von anderen (Tier-)Arten, z.B. Maus und alle Arten von Nagetieren, Mensch und auch andere Säugetiere. Mit diesen Informationen war es dann oft möglich, durch einen Sequenzvergleich konservierte DNA-Bereiche zu

identifizieren, die zur Erstellung eines Primer-Pärchens geeignet waren. Dabei wurde der nicht-kodierende Bereich außerhalb des Leserasters bevorzugt, um möglichst vollständige Sequenzinformation über den kodierenden Bereich innerhalb zu erhalten. In manchen Fällen führte das allerdings nicht zum Erfolg, weshalb der Primer dann möglichst nahe am Anfang und Ende des Gens angesetzt wurde. Mithilfe einer „Cross-species PCR“ (Mai et al., 1994) konnten dann die gewünschten Gerbil-Gene amplifiziert werden. Besonders hilfreich für den Sequenzvergleich waren Informationen über Nagetiere, insbesondere *Mus musculus* (Hausmaus), da durch das „Mouse Genome Project“ das vollständige Genom verfügbar ist. Zwischen Maus und Gerbil konnte ein großer Homologiegrad festgestellt werden (z.B. 81% für IL-6), der allerdings abhängig vom jeweiligen Gen auch stark schwanken konnte. Für den Erhalt eines PCR-Amplifikationsprodukts reichte das jedoch meistens aus.



**Abbildung 4: Sequenzvergleich von IL-6 mit verschiedenen (Tier-)Arten zur Analyse homologer Abschnitte**

Mithilfe der Software BioEdit© konnten bereits existierende Sequenzinformationen aus dem Datenbanksystem GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) so angeordnet werden, dass es in vielen Fällen möglich war, ein 3'- und 5'-Primer-Pärchen zur Durchführung einer „Cross-species-PCR“ zu erhalten. Im gezeigten Sequenzbeispiel für IL-6 wurde die später erhaltene Gerbil-Sequenz zur besseren Vergleichbarkeit mit eingefügt. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit war diese Information nicht verfügbar.

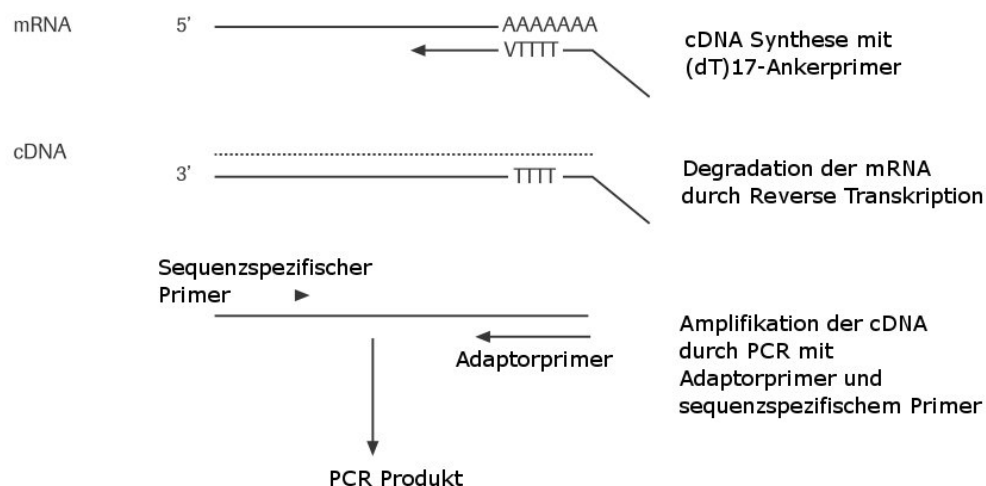
Das Prinzip der „Cross-species PCR“ beruht auf der Begünstigung von Primer-Fehlpaarungen durch eine niedrige Annealing-Temperatur von bis zu 30°C. Dadurch können auch solche Primer binden, die keine vollständige Sequenz-Übereinstimmung aufweisen. Allerdings kommt es dadurch auch zur vermehrten Amplifikation von nicht-spezifischen Nebenprodukten. Durch eine Aufreinigung der Banden im jeweiligen Größenbereich mit einem Agarose-Gel und einer anschließenden Reamplifikation mit denselben Primern, wurde jedoch in fast allen

Fällen ein korrektes PCR-Produkt erhalten. Zur Abklärung eventuell vorhandener Sequenz-Unterschiede wurden von mindestens drei parallelen Ansätzen Sequenzierungen durchgeführt.

### 5.1.3 Klonierung weitgehend unbekannter Sequenzabschnitte

Die bisher genannten Klonierungsmethoden führten insbesondere bei Zytokinen und Chemokinen zum Erfolg. Bei Toll-like Rezeptoren und Oberflächenmolekülen von Dendritischen Zellen waren jedoch meist zu wenig veröffentlichte Sequenzinformationen verfügbar. Es konnte dann z.B. nur ein einzelner homologer Bereich identifiziert werden oder das erhaltene Teilstück war für einen Einsatz in der quantitativen PCR zu kurz.

In diesen Fällen kam eine kombinierte RACE-PCR zum Einsatz (Gaucher et al., 2001). Hierbei waren drei verschiedene Primer notwendig: Ein (dT)<sub>17</sub>-Ankerprimer (5'-GACCACGCGTATCGATGTCTGACTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'), ein Adaptorprimer (5'-GACCACGCGTATCGATGTCTGAC-3') und ein durch Homologievergleich identifizierter sequenzspezifischer Primer.



**Abbildung 5: Klonierung weitgehend unbekannter Sequenzabschnitte mithilfe einer kombinierten RACE-PCR**

Mithilfe einer kombinierten RACE-PCR konnten auch in schwierigen Fällen verwertbare Gerbil-Sequenzen amplifiziert werden. Zuerst wurde eine cDNA-Synthese mit einem (dT)<sub>17</sub>-Ankerprimer durchgeführt. Dieser Primer kann an den Poly-A-Schwanz der RNA binden. Durch die RNase H-Aktivität der Reversen Transkriptase kommt es zu einer Degradation der mRNA. In einer anschließenden PCR-Reaktion werden der Adaptorprimer und ein sequenzspezifischer Primer verwendet. Der spezifische Primer wurde zuvor über einen Homologievergleich in einer möglichst

konservierten Region angesetzt. Bei dieser Methode kommt es zur Amplifikation von sehr viel unspezifischen Nebenprodukten, wodurch mehrere Reinigungsschritte mit einem Agarose-Gel notwendig werden. Die erhaltenen Sequenzinformationen kann man dann für die quantitative TaqMan® PCR weiter verwenden.

Mit dieser Methode kam es zu einer Vielzahl an unspezifischen Amplifikationsprodukten. Die sehr diffusen Banden wurden dann nur anhand der zuvor abgeschätzten Größe aus einem Agarose-Gel aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Amplifikation mit dem Adaptorprimer und dem sequenzspezifischen Primer. Eine erneute Gelaufreinigung und Reamplifikation war in allen Fällen notwendig. In fast allen Fällen konnten sequenzierbare Produkte amplifiziert werden, deren Identität durch einen Vergleich mit bereits bekannten Sequenzen anderer (Tier-)Arten bestätigt werden konnte. Die erhaltenen Produkte wurden nicht weiter verwendet, aber aufgrund dieser Sequenzinformationen konnte dann ein Gerbil-spezifisches Primer-Pärchen angesetzt werden, das zur Amplifikation des gesuchten Gens führte.

Bei allen verwendeten PCR-Methoden wurden die amplifizierten Gerbil-Gene anschließend in einen Vektor subkloniert und sequenziert. Mit diesen Sequenzen konnte die Erstellung von Primern und Sonden für eine TaqMan®-PCR durchgeführt werden. Außerdem wurden die Klonierungsprodukte zur Herstellung eines Plasmid-Standards verwendet. Dieser wird bei einer quantitativen PCR gebraucht, um die Anzahl der gemessenen Gen-Kopien mit einem vorgegebenen Standard vergleichen zu können. Durch die Anwendung der verschiedenen PCR-Methoden konnten insgesamt 26 verschiedene TaqMan®-Systeme etabliert werden.

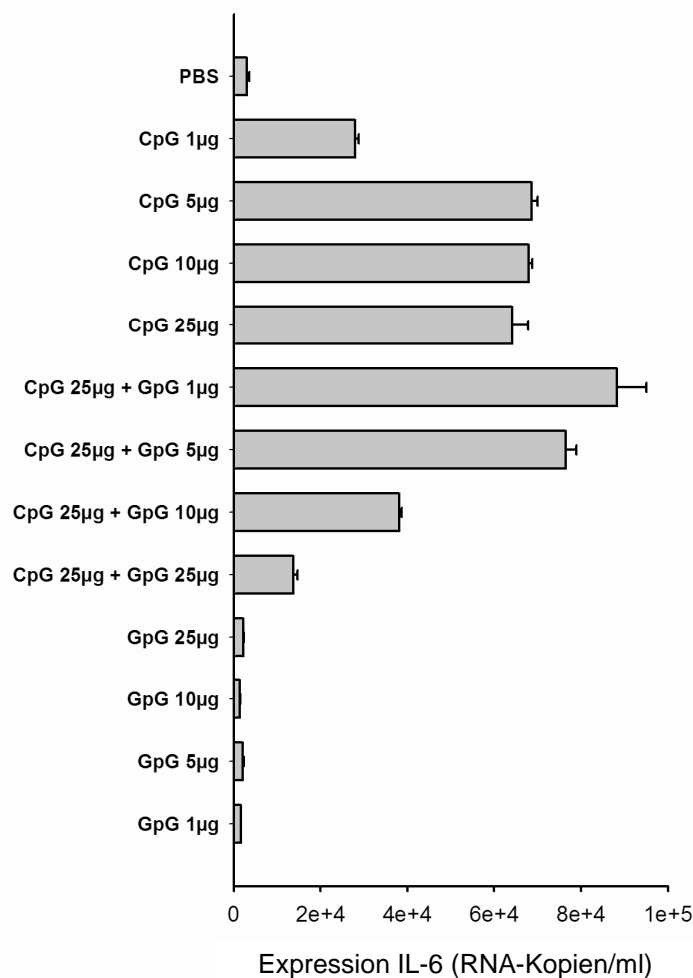
## 5.2 Modulation der *H. pylori*-induzierten Immunantwort durch immunstimulatorische Oligodeoxynukleotide (ODNs)

### 5.2.1 Wirkungsweise von CpG- oder GpG-ODNs im Gerbil-Tiermodell

Eine Infektion mit *H. pylori* führt zu einer Th1-geprägten Reaktion des Immunsystems, die aber nicht in der Lage ist, das Bakterium zu eradizieren. Durch verschiedene immunstimulatorische Substanzen kann die Immunantwort verändert werden. CpG-ODNs (kurze, einzelsträngige Oligodeoxynukleotide mit GC-reicher Sequenzabfolge) sind für ihre Th1-induzierende Wirkung bekannt (Shi et al., 2005; Taylor et al., 2008). Der Austausch von nur einer Base (G statt C) führte in verschiedenen Arbeiten zu einer Inhibition von Th1-Zellen bei Autoimmunerkrankungen (Ho et al., 2003; Ho et al., 2005). Die Wirkung dieser beiden gegensätzlichen ODNs auf die Infektion mit *H. pylori* könnte also beim Einsatz von CpGs in einer möglichen Verstärkung der Th1-Immunantwort liegen, bzw. einer möglichen Suppression durch GpGs. Um den Einfluss der ODNs im Gerbil überprüfen zu können, musste allerdings vorher untersucht werden, ob die für das Mausmodell entwickelten Sequenzabfolgen der ODNs auch im Gerbil Wirkung zeigen.

Dazu wurden naive Gerbil-Splenozyten (d.h. Milzzellen aus Gerbils, die bisher noch keinen Kontakt mit *H. pylori* hatten) in Kultur genommen und mit verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen von CpG- und GpG-Oligodeoxynukleotiden stimuliert. Das Splenozyten-Modell ist eine einfache und zuverlässige Methode, um den Einfluss von lebenden Bakterien, bakteriellen Bestandteilen oder auch einzelner stimulatorischer Substanzen auf die Aktivierung des zellulären Zweiges des Immunsystems zu untersuchen (Deml et al., 2004).

Zur Analyse der Immunantwort diente stellvertretend die Untersuchung des proinflammatorischen Zytokins IL-6, das sich durch seine starke Expression nach einer Stimulation mit CpG-ODNs auszeichnet (Klinman et al., 1996; Watrang et al., 2005; Liu et al., 2008b; Patel et al., 2008).



**Abbildung 6: RNA-Expression von IL-6 im Gerbil-Tiermodell nach Stimulation mit CpG- oder GpG-Oligodeoxynukleotiden (ODNs)**

Um die Stimulationsfähigkeit der für das Maus-Tiermodell optimierten Oligodeoxynukleotid-Sequenzmotive im Gerbil zu überprüfen, wurden Gerbil-Splenozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen von CpG- und GpG-ODNs stimuliert und die RNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 mithilfe der TaqMan®-PCR gemessen. Das Splenozyten-Modell stellt ein etabliertes System zur Analyse von zellulären Immunantworten dar. Zunächst wurden die Splenozyten mit PBS als Negativkontrolle und einer aufsteigenden Konzentration von CpG-ODNs stimuliert. Es konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der RNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 beobachtet werden. Dann wurde das CpG-ODN bei einer konstanten Konzentration von 25µg/ml belassen, das GpG-ODN wurde in aufsteigender Konzentration hinzugefügt. Hierbei konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der IL-6-RNA-Produktion beobachtet werden. Eine Stimulation mit GpG-ODN allein führte zu keiner signifikant erhöhten Expression des Zytokins. Die beiden im Mausmodell aktiven CpG- und GpG-ODNs konnten also auch im Gerbil-Splenozytenmodell *in vitro* die Induktion einer Th1-Immunantwort durch die Stimulation mit CpG-ODNs hervorrufen, und die Suppression dieser durch die Zugabe von GpG-ODNs.

Abgebildet sind Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen; n=3

PBS wurde als Negativkontrolle verwendet und es zeigte sich im Rahmen der versuchsüblichen Schwankungen nur eine basale Expression von IL-6-RNA (Abbildung 6). Im ersten Versuchsteil führte die Zugabe einer ansteigenden Konzentration von CpG-ODNs zu einer gesteigerten Transkription von IL-6. Das CpG-ODN war also in der Lage, die RNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins konzentrationsabhängig zu steigern. In einem zweiten Versuchsteil wurde die Konzentration von CpG-ODNs bei einer konstanten Konzentration von 25µg/ml belassen, das Th-1-suppressive GpG-ODN wurde jedoch zusätzlich in steigenden Konzentrationen hinzugegeben. Hier zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Expression von IL-6-RNA, das GpG-ODN konnte also die durch CpG-ODNs hervorgerufene RNA-Produktion inhibieren. Die Inkubation nur mit GpG-ODN führte im Rahmen der versuchsüblichen Schwankungen zu keiner verstärkten Transkription von IL-6. Die ODNs zeigten also im Gerbil Splenozyten-Modell *in vitro* eine Verstärkung der RNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 durch CpG-ODN und eine suppressive Wirkung durch GpG-ODN. Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob und inwieweit sich die durch *H. pylori*-induzierte Immunantwort im Gerbil-Infektionsmodell, also *in vivo*, durch die Verabreichung der beiden ODNs beeinflussen lässt.

### **5.2.2 Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte Immunantwort**

Durch den eben vorgestellten Vorversuch konnte die Wirksamkeit von CpG- und GpG-ODNs *in vitro* im Gerbil-Tiermodell nachgewiesen werden. Bisherige Arbeiten mit diesen beiden ODNs beschränkten sich allerdings auf Versuche an Mäusen (Ho et al., 2003; Ho et al., 2005). Dieses Tiermodell ist allerdings für die Untersuchung von *H. pylori* nur bedingt geeignet, da die Infektion bei Mäusen nur zu einer schwach ausgeprägten Gastritis führt (Rabelo-Goncalves et al., 2005). Bei Gerbils kommt es zu charakteristischen Entzündungsreaktionen im Magen (Osawa et al., 2001), weshalb die Wirkungsweise der beiden ODNs in einem Infektionsversuch mit diesem Tiermodell untersucht werden soll.

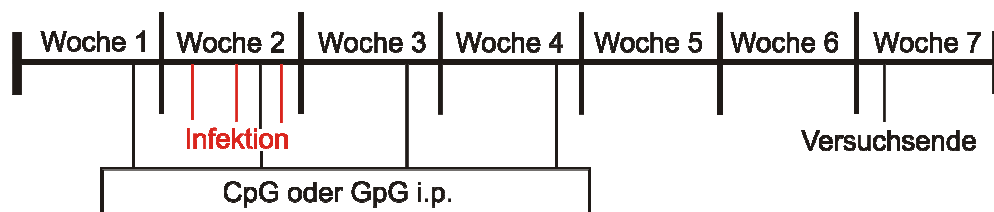
Die Verabreichung der beiden ODNs sollte eine gegensätzliche Reaktion auf den Infektionsverlauf mit *H. pylori* ausüben. Das CpG-ODN hätte mit seiner Th1-verstärkenden Wirkung zu einer stärkeren Ausprägung der durch das Bakterium



hervorgerufenen Immunantwort und damit möglicherweise auch zu einer Aggravation der Entzündungsreaktionen im Magen führen können. Das GpG-ODN könnte andererseits zu einer Suppression der Th1-Immunantwort beitragen und damit zu einer eventuell verminderten Gastritis.

In verschiedenen Versuchsgruppen wurde die Verabreichung der beiden immunstimulatorischen CpG- oder GpG-ODNs untersucht. Dabei wurde eine intraperitoneale Injektion kurz vor, während und nach der Infektion mit *H. pylori* gewählt. Diese Verabreichungsform garantiert aufgrund der dort vorhandenen gut ausgeprägten Blutversorgung und zahlreicher vorhandener Immunzellen eine gute Verteilung und Wirksamkeit der injizierten Substanzen.

#### Zeitlicher Ablauf:



#### Gruppenaufteilung:

Gruppe (1): BB + PBS i.p. => keine Infektion, keine Behandlung

(BB = Brucella-Bouillon: Medium für Infektion mit *H. pylori*)

Gruppe (2): Infektion Hp + PBS i.p. => Infektion, keine Behandlung

Gruppe (3): Infektion Hp + CpG i.p. => Infektion + Behandlung mit CpG-ODN

Gruppe (4): Infektion Hp + GpG i.p. => Infektion + Behandlung mit GpG-ODN

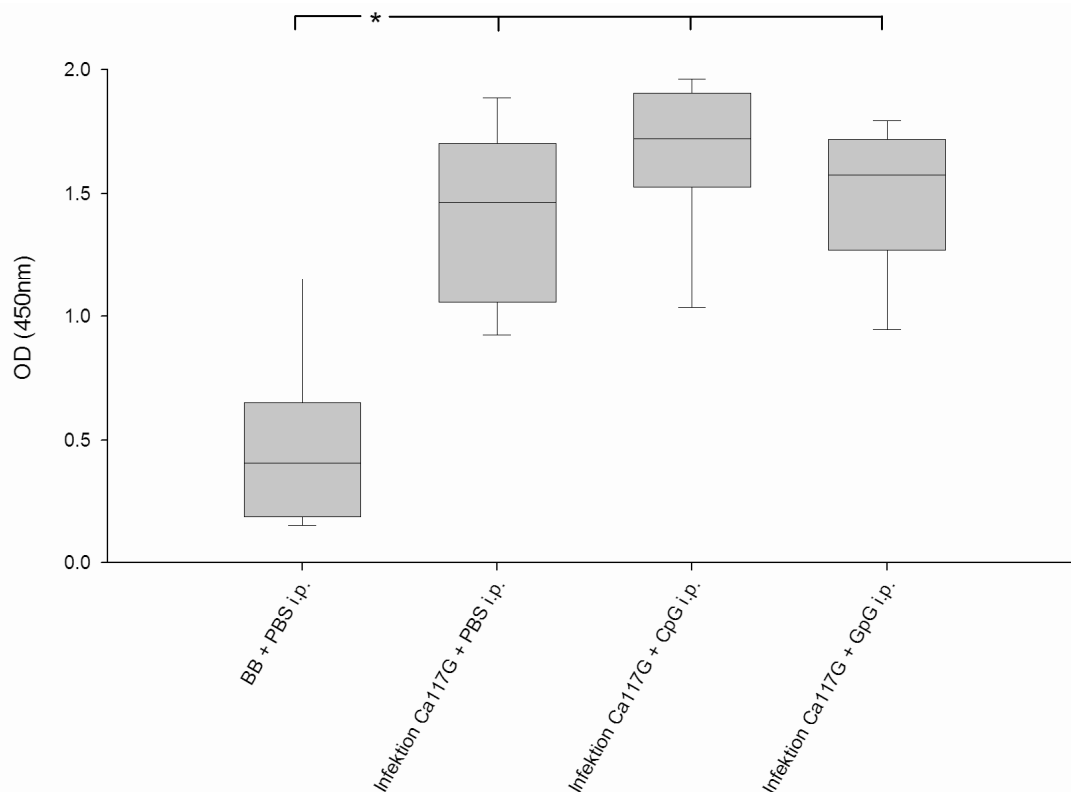
Der zeitliche Versuchsablauf gestaltete sich wie folgt: Das CpG- oder GpG-ODN wurde insgesamt viermal intraperitoneal mit jeweils einer Injektion pro Woche verabreicht. Die beiden Kontrollgruppen (1, 2) erhielten nur eine Injektion mit PBS, Gruppe (2) wurde zusätzlich als Infektionskontrolle mit *H. pylori* infiziert. Die ODNs wurden einmal vor Infektion mit *H. pylori*, während und zwei Mal nach Infektion verabreicht. Das Experiment wurde nach vier Wochen Infektionsdauer beendet. Die Versuche wurden drei Mal zu unterschiedlichen Zeitpunkten und voneinander unabhängig durchgeführt.

Die meisten in der Literatur mit Gerbils durchgeführten Infektionsexperimente mit *H. pylori* erstrecken sich über einen längeren Zeitraum, da es dadurch zu

ausgeprägten Entzündungsreaktionen im Magen kommt (Cao et al., 2007; Tatematsu et al., 2007; Jin et al., 2008; Kuo et al., 2008). Die Infektionsdauer von vier Wochen wurde in dieser Arbeit aufgrund der in der Arbeitsgruppe vorhandenen Erfahrungen mit einem Kurzzeitinfektionsmodell gewählt. Dabei kommt es mit dem hierfür verwendeten Bakterien-Stamm schon nach kurzer Zeit zu einer starken Immunreaktion und einer ausgeprägten Inflammation der Magenschleimhaut.

#### **5.2.2.1 Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte Bildung spezifischer Antikörper**

Nach dem Einschläfern der Gerbils erfolgten zuerst die Blutentnahme aus dem Herzen und die Gewinnung des Serums. Die Bestimmung des *H. pylori*-Antikörpertiters, genauer gesagt des Immunglobulins G, wurde mithilfe eines ELISA durchgeführt. Antikörper, sogenannte Immunglobuline, sind Proteine, die in Wirbeltieren als Reaktion auf Antigene gebildet werden. Es gibt verschiedene Klassen von Antikörpern, die sich sowohl in Struktur als auch zeitlichem Auftreten unterscheiden. Immunglobulin G wird erst in der Phase der adaptiven Immunantwort gebildet, bleibt dafür aber lange im Serum nachweisbar. Dieses Protein ist ein sehr guter Indikator für eine bereits länger andauernde oder durchgemachte Infektion. Der positive Nachweis von *H. pylori* Antikörpern korreliert in hohem Maße mit einer Keimbesiedlung des Magens (Moujaber et al., 2008). Somit ist der Antikörpertiter neben seiner immunologischen Bedeutung auch ein guter Maßstab, um eine Kolonisierung mit *H. pylori* und damit auch die Effektivität der durchgeführten Infektionsexperimente zu überprüfen.



**Abbildung 7: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte Bildung spezifischer Antikörper**

Die Bestimmung des Antikörpertiters, in diesem Fall von *H. pylori*-spezifischem Immunglobulin G, diente sowohl zur Analyse der durch das Bakterium induzierten Immunantwort, als auch zur Überprüfung der Infektionseffizienz. Dazu wurde ein ELISA verwendet. Während sich in der nicht-infizierten Gruppe (1) eine unspezifische Reaktion von Immunglobulin G zeigte, konnte im Vergleich dazu in allen infizierten Gruppen (2, 3, 4) eine signifikante Erhöhung von *H. pylori*-spezifischem Immunglobulin G nachgewiesen werden. Die Behandlung mit unterschiedlichen ODNs hatte auf die Ausprägung des IgG-Titers keinen Einfluss.

\*  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=9$

In Abbildung 7 wird der Einfluss einer Infektion mit *H. pylori* und der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf den *H. pylori*-spezifischen Antikörpertiter gezeigt. In der nicht-infizierten Kontrollgruppe, die nur eine Injektion mit PBS erhielt (1), konnte eine unspezifische Bindung von IgG mit *H. pylori* Antigenen festgestellt werden. Im Vergleich dazu zeigte sich bei allen infizierten Gerbils (2, 3, 4) eine signifikant erhöhte Produktion von *H. pylori*-spezifischen Antikörpern. Diese Steigerung ist jedoch nur auf eine Infektion mit *H. pylori* zurückzuführen, die Behandlung mit unterschiedlichen ODNs spielte dabei keine Rolle. Sowohl die Injektion von CpG- (3) als auch GpG-ODNs (4) hatte keinen signifikanten Einfluss

auf die Ausprägung des *H. pylori*-spezifischen Antikörpertiters im Vergleich zur Infektionskontrolle (2). Eine Infektion mit *H. pylori* führte also zu einer gesteigerten Produktion von gegen das Bakterium gerichtetem Immunglobulin G, die durch die Verabreichung von ODNs nicht beeinflusst wurde.

#### **5.2.2.2 PCR-Nachweis von *H. pylori*-DNA im Magengewebe**

Nach der Blutentnahme zur Gewinnung des Serums wurde der Magen für die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden präpariert. Ein Teil des Magens wurde für eine spätere DNA-Extraktion und den Nachweis von *H. pylori* durch eine quantitative PCR mittels LightCycler® verwendet. Dazu wurde mithilfe spezieller Primer ein charakteristischer Bereich innerhalb des Urease A-Gens amplifiziert. Urease ist ein für *H. pylori* essentielles Enzym, das aus den beiden Untereinheiten A und B besteht. Es ist in der Lage, Harnstoff unter anderem zu Ammoniak umzusetzen. Dadurch wird das extrem saure Milieu des Magens abgepuffert und dem Bakterium dadurch das Überleben und die Kolonisierung ermöglicht. Der Nachweis des Urease-Gens mithilfe einer LightCycler® PCR ist eine relativ einfache und sichere Methode, um auch im Gerbil die Präsenz von *H. pylori* im Magengewebe feststellen zu können.

Die Amplifizierung des Urease-Gens ist eine am Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie etablierte Methode, um eine Infektion des Menschen mit *H. pylori* aus Biopsiematerial nachzuweisen (Bulajic et al., 2002). Diese Methode eignet sich nicht für einen quantitativen Vergleich der Bakterienlast, da keine Normalisierung mit einem Haushaltsgen, wie z.B. HPRT, vorgenommen wird. Sie eignet sich also lediglich als Kontrolle für den Erfolg der durchgeführten Infektionsexperimente.

	BB + PBS i.p. (1)	Infektion Hp + PBS i.p. (2)	Infektion Hp + CpG i.p. (3)	Infektion Hp + GpG i.p. (4)
Gesamtanzahl Gerbils	9	9	9	9
DNA-Nachweis positiv	0	9	9	9
DNA-Nachweis negativ	9	0	0	0

**Tabelle 5: PCR-Nachweis von *H. pylori*-DNA im Magengewebe**

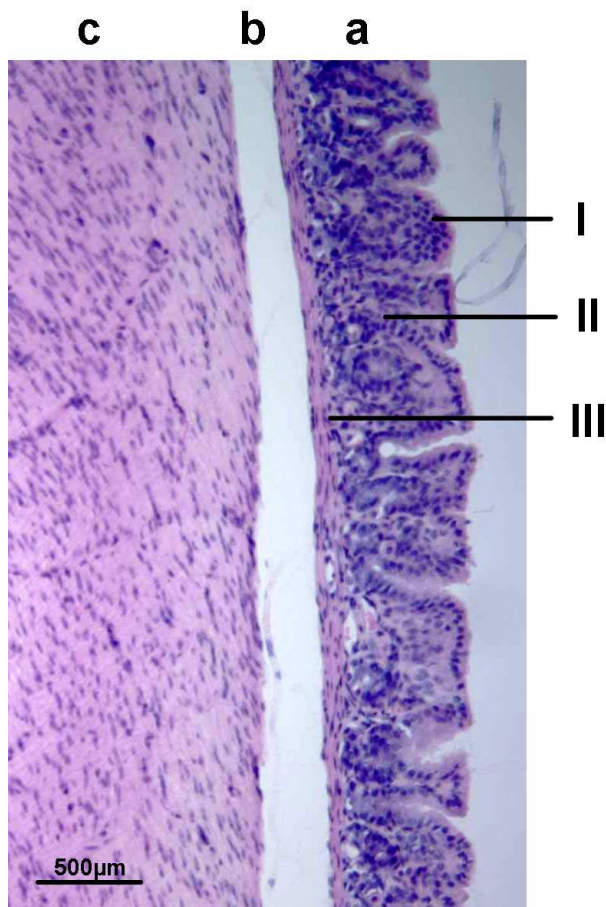
Der PCR-Nachweis von *H. pylori*-DNA im Magengewebe erfolgte durch die Amplifizierung eines charakteristischen Bereichs des Urease-Gens. Eine quantitative Bestimmung der Bakterienlast ist mit dieser Methode nicht möglich, es handelte sich lediglich um eine Kontrolle der Infektionseffizienz. Während in allen nicht-infizierten Gerbils keine DNA von *H. pylori* im Magengewebe festgestellt werden konnte, war sie bei allen infizierten Tieren nachweisbar.

Wie in Tabelle 5 gezeigt, konnte in allen neun nicht-infizierten Kontrolltieren keine *H. pylori*-DNA im Magengewebe festgestellt werden, die im Gegensatz dazu in allen 27 infizierten Gerbils vorhanden war. Die durchgeführten Infektionen führten also immer zu einer erfolgreichen Kolonisierung des Magens. Somit eignet sich diese Methode auch für einen Nachweis von *H. pylori*-DNA im Gerbil-Tiermodell.

### 5.2.2.3 Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte Histopathologie des Magens

Ein weiterer Streifen des Gerbil-Magens wurde zur histologischen Auswertung verwendet. Nach der kurzfristigen Lagerung in einem vierprozentigen Formalinbad, erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe die Entwässerung der Proben, das Einbetten in Paraffin und eine Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE). Diese Färbemethode dient der Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild anhand von zwei verschiedenen Einzelfärbungen, wodurch krankhafte Veränderungen in Biopsien untersucht werden können.

Histologisch lässt sich die Magenwand in fünf mehr oder weniger deutlich voneinander unterscheidbare Schichten einteilen. In Abbildung 8 ist der strukturelle Aufbau des Antrums im Säuger-Magen am Beispiel von *Meriones unguiculatus* gezeigt.



**Abbildung 8: Struktureller Aufbau des Antrums im Säuger-Magen am Beispiel von *Meriones unguiculatus* (HE-Färbung)**

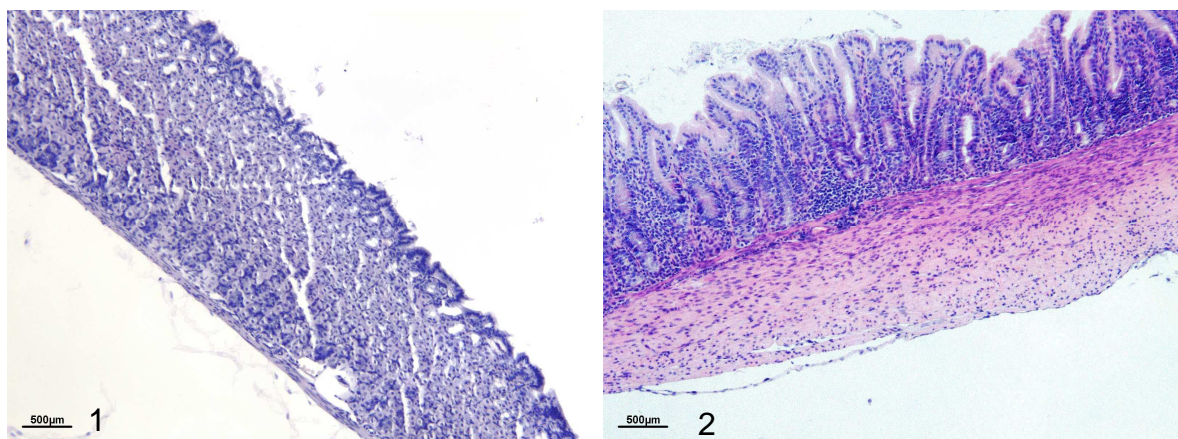
Histologische Merkmale des Magens: Die Magenwand besteht aus fünf Schichten,

- a) *Tunica mucosa*
  - I) *Lamina epithelialis mucosae*
  - II) *Lamina propria mucosae*
  - III) *Lamina muscularis mucosae*
- b) *Tela submucosa*
- c) *Tunica muscularis*

Die *Tunica mucosa* bildet die Mageninnenwand und ist der funktionell bedeutsamste Bereich. Sie ist in drei Schichten aufgeteilt: Das einschichtige Magenepithel, *Lamina epithelialis mucosae*, sezerniert einen sehr viskosen Schleim, der das Magengewebe vor Schädigung durch den sauren Magensaft schützt. Darunter liegt die *Lamina propria mucosae*, in welcher sich die Magendrüsen befinden, die von retikulärem Bindegewebe umgeben sind und dadurch gestützt werden. Entzündungszellen wie z.B. Lymphozyten oder Makrophagen können diese Bindegewebsschicht infiltrieren. Als Basis besitzt die

*Tunica mucosa* noch eine Schicht aus glatter Muskulatur, die *Lamina muscularis mucosae*. Unter der *Tunica mucosa* liegt die *Tela submucosa*, die v.a. aus lockerem Bindegewebe und zahlreichen Blut- und Lymphgefäßen besteht und in der auch Nervenzellen (Meißner-Plexus) vorhanden sind. Als fünfte und letzte Schicht ist hier die *Tunica muscularis* zu erwähnen, die aus glatter Muskulatur besteht. Wie die Submukosa ist auch die *Tunica muscularis* von Nervenzellen durchzogen (Auerbach-Plexus).

Bei einer Infektion mit *H. pylori* kommt es zu stark ausgeprägten histopathologischen Veränderungen der Magenschleimhaut, wobei die durch das Bakterium hervorgerufenen Entzündungserscheinungen hauptsächlich das Antrum betreffen (Galamb et al., 2008). Dies konnte anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente auch für den Gerbil-Magen bestätigt werden. In den histologischen Präparaten konnte nur in einigen wenigen Einzelfällen eine leichte Beteiligung des Korpus am Entzündungsgeschehen beobachtet werden und auch dann nur am Übergang zum Antrum. Das Entzündungsgeschehen spielte sich hauptsächlich im Antrum ab.

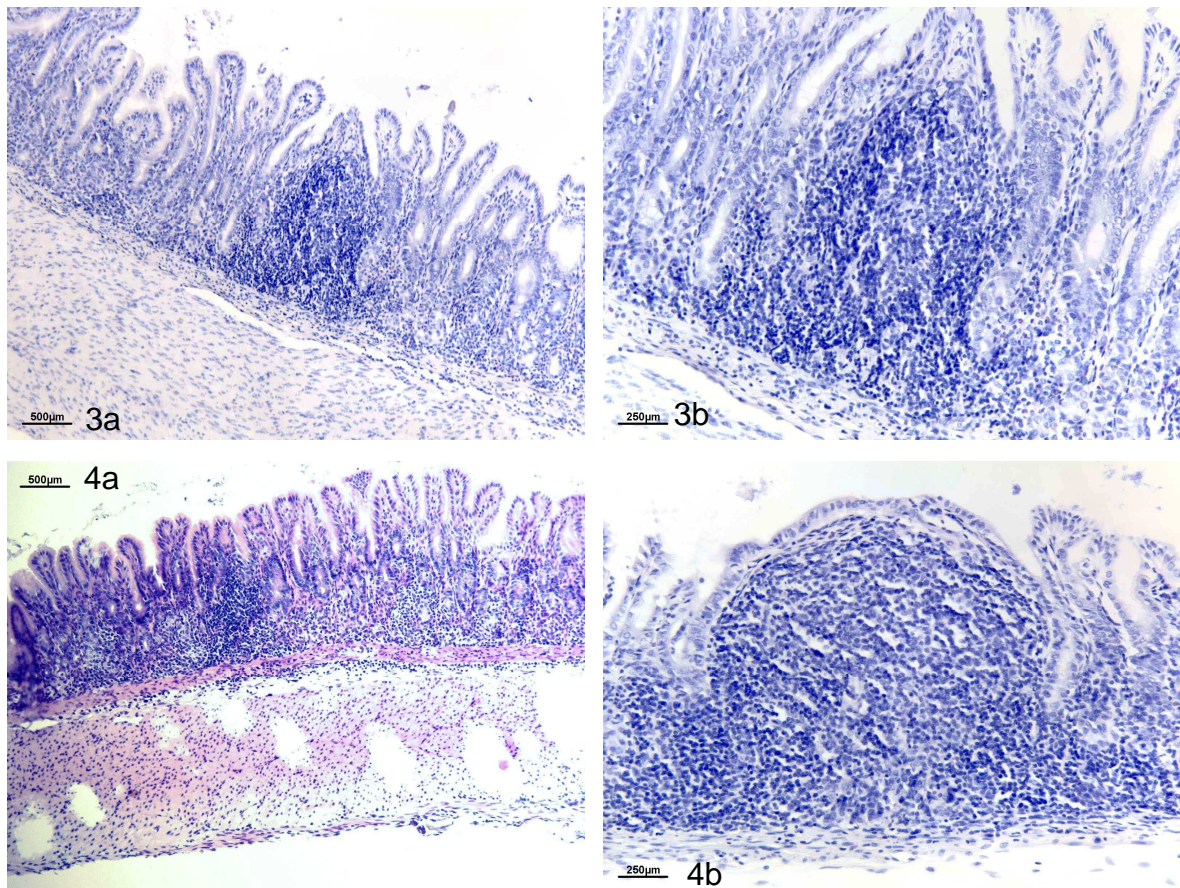


**Abbildung 9: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG- ODNs auf *H. pylori*-induzierte Entzündungserscheinungen im Magen (HE-Färbung)**

Gruppe (1): BB + PBS i.p. => Antrum, 100fache Vergrößerung

Gruppe (2): Infektion Hp + PBS i.p. => Antrum, 100fache Vergrößerung





Gruppe (3): Infektion Hp + CpG i.p. => 3a: Antrum, 100fache Vergrößerung; 3b: Lymphfollikel, 200fache Vergrößerung

Gruppe (4): Infektion Hp + GpG i.p. => 4a: Antrum, 100fache Vergrößerung; 3b: Lymphfollikel, 200fache Vergrößerung

In der nicht-infizierten Kontrolle (1) konnten keine histopathologischen Veränderungen beobachtet werden. Alle mit *H. pylori* infizierten Tiere (2, 3, 4) wiesen eine ausgeprägte Infiltration von Entzündungszellen auf, die sich allerdings auf die Lamina beschränkte und nicht in die Tiefe des Bindegewebes reichte. Gewebedysplasie (Veränderungen der Gewebestruktur) und vereinzelte Lymphfollikel (Ansammlung von Entzündungszellen) konnten bei allen infizierten Gerbils nachgewiesen werden. Die histologischen Veränderungen des Magengewebes waren dabei nur von einer Infektion mit *H. pylori* abhängig (2), nicht jedoch von einer Behandlung mit CpG- oder GpG-ODN (3, 4).

Bei allen nicht-infizierten Tieren (1) konnten, wie in Abbildung 9 gezeigt, keine auffälligen Veränderungen der Magenschleimhaut beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde in infizierten Gerbils (2, 3, 4) eine ausgeprägte Entzündungsreaktion sichtbar. Diese beinhaltete bei allen Tieren die Infiltration von Entzündungszellen, wie z.B. Lymphozyten. Allerdings blieb diese auf die



Lamina beschränkt und reichte selten bis zur *Tela submucosa* und nie zur *Tunica muscularis*. Gewebedysplasie und Lymphfollikel konnten bei allen infizierten Gerbils nachgewiesen werden. Unter dem Begriff Dysplasie versteht man eine Abweichung der Gewebestruktur vom normalen Bild. Treten Dysplasien gehäuft und schwer auf, können sie als präkanzeröse Vorstufen angesehen werden. Lymphfollikel kommen in normaler Magenmukosa nicht vor und treten typischerweise bei einer Infektion mit *H. pylori* auf (Achyut et al., 2008a; Achyut et al., 2008b; Shibata et al., 2006). Die *H. pylori*-induzierte Gastritis führt zur Ausbildung intramukosaler Lymphfollikel und zur Akkumulation von B-Zellen. Lymphfollikel dienen am Eintrittsort des Antigens als Zentren zur Aktivierung von Lymphozyten und auch zur starken Produktion von Immunglobulinen durch Plasmazellen. Dieses Lymphgewebe zeigt die morphologischen Charakteristika des MALT (**M**ucosa **A**ssociated **L**ymphoid **T**issue), womit Lymphfollikel als Vorstufe eines Magenlymphoms einzuordnen sind. Diese starken Veränderungen der Magenschleimhaut konnten in dieser Arbeit im Gegensatz zu nicht-infizierten Tieren in allen mit *H. pylori* infizierten Gerbils beobachtet werden. Eine Infektion mit *H. pylori* führte also bei allen infizierten Tieren zu Veränderungen der histologischen Strukturen der Magenschleimhaut, diese waren jedoch in ihrem Ausprägungsgrad unabhängig von einer Behandlung mit CpG- oder GpG-ODNs.

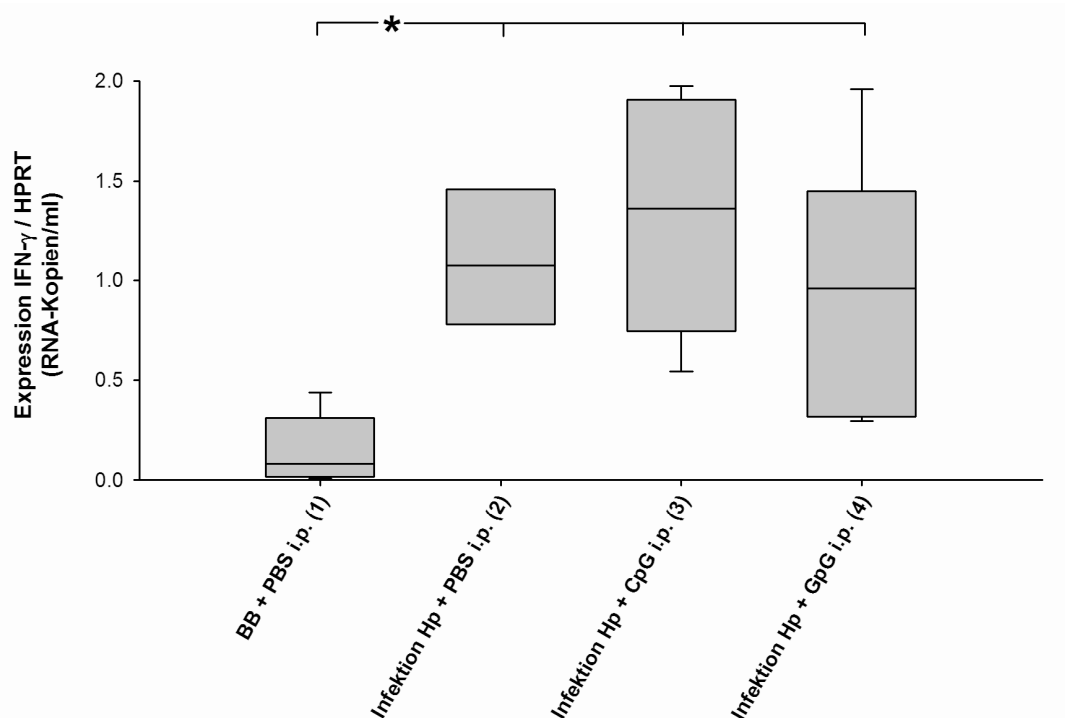
#### **5.2.2.4 Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression im Magengewebe**

##### **5.2.2.4.1 Proinflammatorische Zytokine**

Ein weiterer Teil des Gerbil-Magens wurde zur Erstellung eines RNA-Expressionsprofils verwendet. Um einen Abbau der empfindlichen RNA und damit eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern, wurden die Magenstreifen sofort nach der Präparation in eine spezielle RNA-stabilisierende Aufbewahrungslösung verbracht. Nach der Extraktion der RNA und anschließender reverser Transkription, konnte mithilfe der TaqMan®-PCR ein genaues RNA-Expressionsprofil des Magengewebes erstellt werden. Eine Infektion mit *H. pylori* führt zu einer charakteristischen Expression von immunologisch bedeutsamen Proteinen im Magengewebe. Durch das Erstellen eines genauen

Expressionsprofils lässt sich die durch das Bakterium induzierte Immunantwort genauer charakterisieren.

Zytokine spielen bei der *H. pylori*-Infektion eine sehr wichtige Rolle (Goll et al., 2007; Oderda et al., 2007; Di Bonaventura et al., 2007; Yamauchi et al., 2008). Es handelt sich dabei um Proteine, die von den Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sekretiert werden. Sie werden als Antwort auf die Invasion von Mikroben oder Kontakt mit Antigenen gebildet. Die Klasse der Zytokine besteht aus einer Vielzahl von Untergruppen. Sie beinhaltet Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine. Generell lassen sich Zytokine in zwei Funktionsklassen einteilen: Proinflammatorische und antiinflammatorische bzw. regulatorische Zytokine. Bei einer Infektion mit *H. pylori* spielen hauptsächlich proinflammatorische Zytokine eine wichtige Rolle (Kang et al., 2008; Tu et al., 2008; Con et al., 2009), wobei IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF und IL-18 klassische Vertreter dieser Gruppe darstellen.



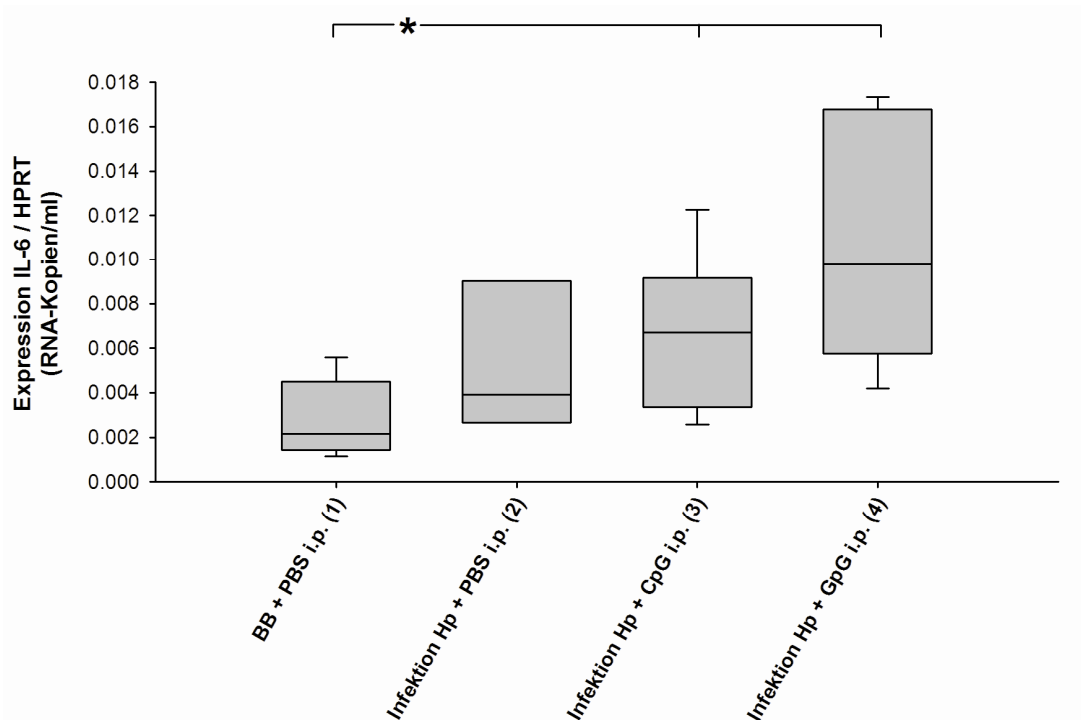
**Abbildung 10: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von IFN- $\gamma$  im Magengewebe**

Die RNA-Expression im Magengewebe wurde mithilfe einer quantitativen TaqMan®-PCR analysiert. Zur Normalisierung der Messwerte wurde der Quotient aus der RNA-Expression des entsprechenden Ziel-Gens und dem konstitutiv exprimierten Gen HPRT (Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase) gebildet. Im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1), konnte in allen

mit *H. pylori* infizierten Versuchsgruppen (2, 3, 4) eine stark erhöhte RNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  beobachtet werden. Die Verabreichung von CpG- oder GpG-ODNs (3, 4) führte dabei zu keiner signifikanten Veränderung der RNA-Expression im Vergleich zur Infektion mit *H. pylori* (2).

\* = RNA-Expression signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1),  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=9$  bzw. 8 für Gruppe (2)

Wie in Abbildung 10 gezeigt konnte, im Gegensatz zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1), die stark erhöhte Expression dieses für die Th1-Immunantwort sehr wichtigen Zytokins statistisch signifikant in allen infizierten Gerbils beobachtet werden (2, 3, 4). Der Einsatz von ODNs (3, 4) hatte auf die Veränderung der RNA-Expression keinen Einfluss.

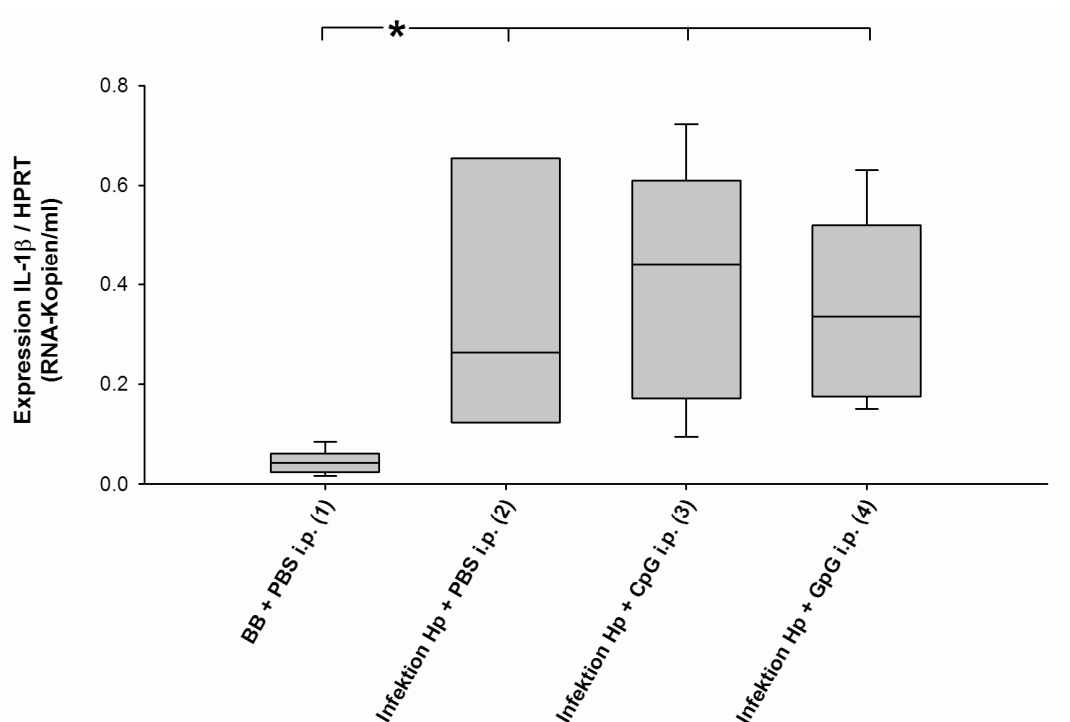


**Abbildung 11: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von IL-6 im Magengewebe**

Eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 konnte im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) nur in den mit CpG- oder GpG-ODNs behandelten Versuchsgruppen (3, 4) beobachtet werden. Eine Infektion mit *H. pylori* ohne Injektion von ODNs führte zu keiner signifikanten Steigerung der RNA-Expression.

\* = RNA-Expression signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1),  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=9$  bzw. 8 für Gruppe (2)

Die Injektion von CpG- und GpG-ODNs (3, 4) führte, wie in Abbildung 11 gezeigt, zu einer statistisch signifikant erhöhten RNA-Expression von IL-6 im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1). Auch in der Literatur ist der starke Einfluss von ODNs vor allem auf die Produktion von IL-6 bekannt (Klinman et al., 1996; Watrang et al., 2005; Patel et al., 2008). In dieser Arbeit konnte kein Unterschied in der RNA-Expression zwischen der Gabe von CpG- (3) oder GpG-ODNs (4) festgestellt werden. Bei einer Infektion mit *H. pylori* allein kam es zu einer schwachen, jedoch nicht statistisch signifikanten Steigerung der RNA-Expression.



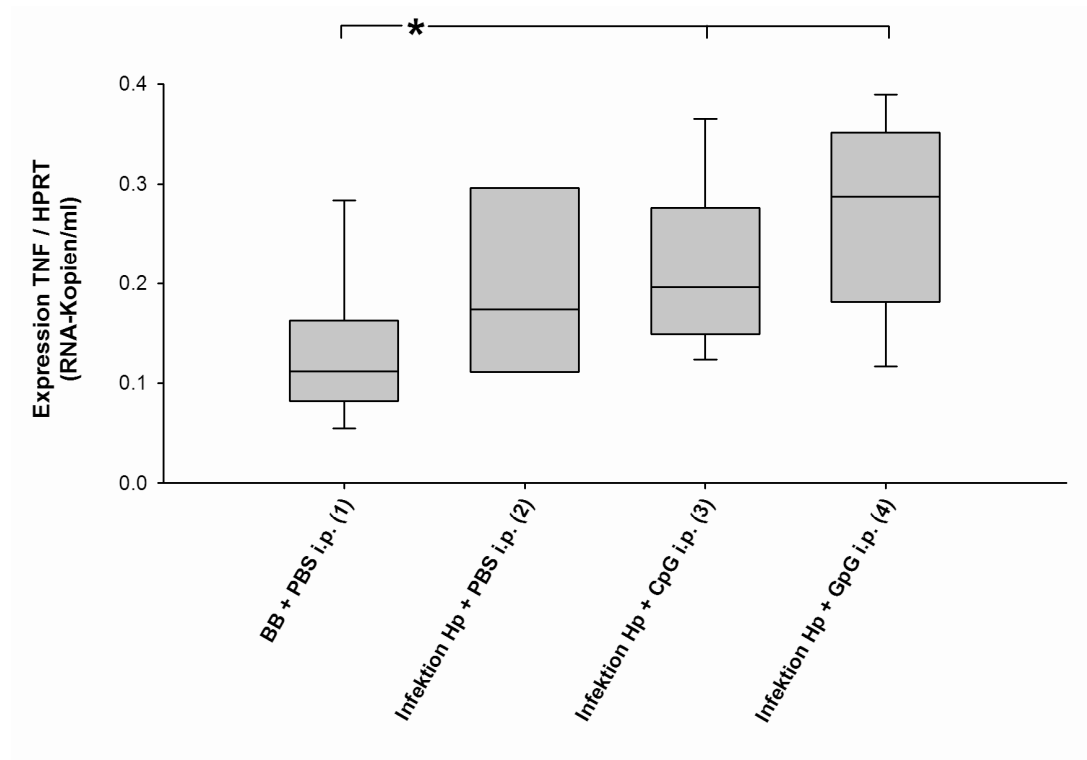
**Abbildung 12: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von IL-1 $\beta$  im Magengewebe**

Im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) konnte in allen mit *H. pylori* infizierten Versuchsgruppen (2, 3, 4) eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  beobachtet werden. Die Verabreichung von CpG- oder GpG-ODNs (3, 4) führte dabei zu keiner signifikanten Veränderung der RNA-Expression im Vergleich zur Infektion mit *H. pylori* (2).

\* = RNA-Expression signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1),  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=9$  bzw. 8 für Gruppe (2)

In Abbildung 12 ist gezeigt, wie es im Gegensatz zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) nach einer Infektion mit *H. pylori* bei allen infizierten Gerbils (2,

3, 4) zu einer starken Expression von IL-1 $\beta$ -RNA kam. Die Injektion von CpG- (3) oder GpG-ODNs (4) hatte auf die Veränderung der RNA-Expression keinen Einfluss im Vergleich zur Infektion mit *H. pylori* (2).



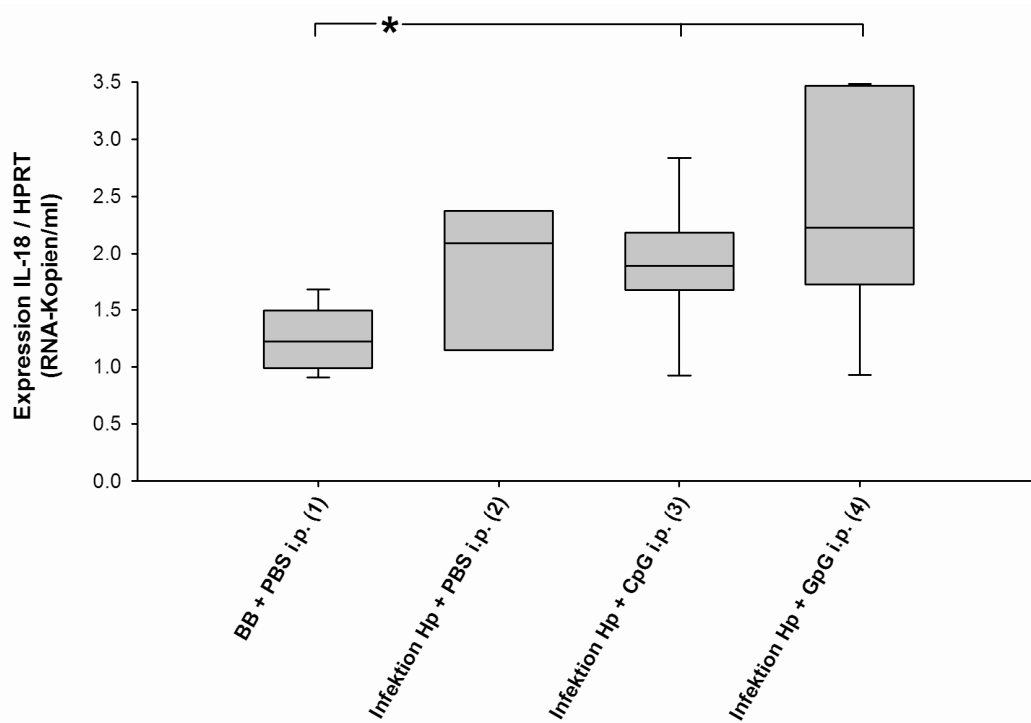
**Abbildung 13: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von TNF im Magengewebe**

Eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression von TNF konnte im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) nur in den mit CpG- oder GpG-ODNs behandelten Versuchsgruppen (3, 4) beobachtet werden. Eine alleinige Infektion mit *H. pylori* ohne Injektion von ODNs (2) führte zu keiner signifikant gesteigerten RNA-Expression.

\* = RNA-Expression signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1),  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=9$  bzw. 8 für Gruppe (2)

Wie in Abbildung 13 gezeigt, führte die Injektion von ODNs (3, 4) zu einer stark erhöhten RNA-Expression von TNF, im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der RNA-Expression zwischen der Verabreichung von CpG- (3) oder GpG-ODNs (4) festgestellt werden. Bei einer alleinigen Infektion mit *H. pylori* kam es zu einer schwachen, jedoch nicht statistisch signifikanten Steigerung der TNF-RNA-Expression.

IL-12 ist der Hauptmediator der frühen akuten Immunantwort. Das Protein existiert als Heterodimer mit einer 35-kD (p35) und einer 40-kD (p40) Untereinheit, wobei die Expression der p40-Untereinheit die immunologisch aktive Form des Zytokins darstellt. Zum Zeitpunkt vier Wochen nach Infektion der Gerbils mit *H. pylori* konnte im Vergleich zu den Kontrollgruppen in keiner der Versuchsgruppen eine statistisch signifikante Veränderung der RNA-Expression von IL-12 p35 oder p40 beobachtet werden (siehe Tabelle 5).



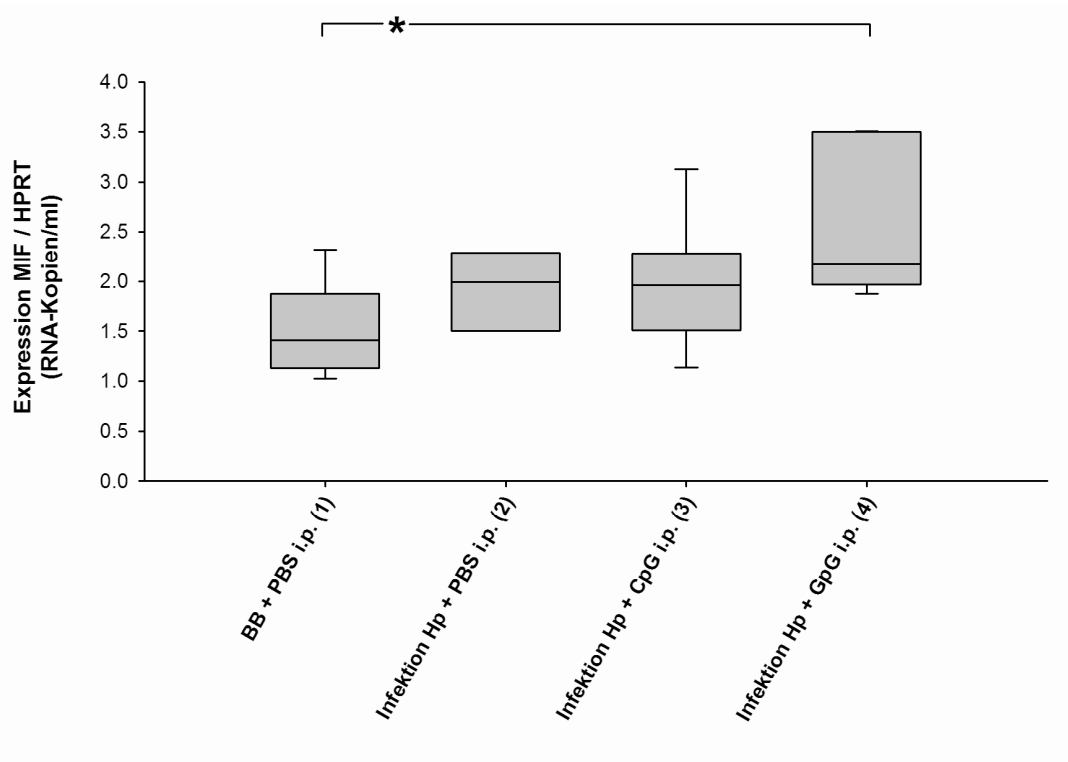
**Abbildung 14: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von IL-18 im Magengewebe**

Im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) konnte eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression von IL-18 nur in den mit CpG- oder GpG-ODNs behandelten Versuchsgruppen (3, 4) beobachtet werden. Es konnte dabei kein Unterschied in der RNA-Expression zwischen der Verabreichung von CpG- (3) oder GpG-ODNs (4) festgestellt werden.

\* = RNA-Expression signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1),  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=9$  bzw. 8 für Gruppe (2)

Die Injektion von CpG- und GpG-ODNs (3, 4) führte, wie in Abbildung 14 gezeigt, zu einer statistisch signifikant erhöhten RNA-Expression von IL-18 im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1). Es konnte kein Unterschied in der RNA-Expression zwischen der Verabreichung von CpG- (3) oder GpG-ODN (4)

festgestellt werden. Im Gegensatz dazu kam es bei einer Infektion mit *H. pylori* allein (2) zu einem schwachen, jedoch nicht statistisch signifikanten Anstieg der IL-18-RNA-Expression.



**Abbildung 15: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von MIF im Magengewebe**

Eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression von MIF konnte im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) nur in der mit GpG-ODNs behandelten Versuchsgruppe (4) beobachtet werden. Sowohl die Infektionskontrolle (2), als auch die mit CpG-ODN (3) behandelten Gerbils zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Veränderung der RNA-Expression.

\* = RNA-Expression signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1),  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=9$  bzw. 8 für Gruppe (2)

Abbildung 15 zeigt eine im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression von MIF (Makrophagen-Migrations-inhibierender Faktor) nur bei GpG-ODN behandelten Tieren (4). Sowohl die Infektionskontrolle ohne ODN-Injektion (2) als auch die mit CpG-ODN behandelte Gruppe (3) zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Steigerung der RNA-Expression.

#### 5.2.2.4.2 Antiinflammatorische Zytokine

Als Gegenspieler zu proinflammatorischen Zytokinen fungieren antiinflammatorische bzw. regulatorische Zytokine. Sie sind charakteristisch für eine Th2-geprägte Immunantwort. Dabei dient IL-4 als Leitzytokin, indem es die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Richtung Th2 fördert. IL-10 zeigt eine starke regulatorische Funktion, indem es zelluläre Immunreaktionen über eine negative Feedbackschleife inhibiert.

In dieser Arbeit konnte zum Zeitpunkt vier Wochen nach Infektion der Gerbils mit *H. pylori* im Vergleich zu den Kontrollgruppen in keiner der behandelten und infizierten Gruppen eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression von IL-4 oder IL-10 nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5).

#### 5.2.2.4.3 Chemokine und iNOS

IL-8 ist ein Chemokin, das chemotaktisch auf eine Reihe von Immunzellen wirkt. Mäuse besitzen kein humanes IL-8 Homolog, allerdings gibt es hier die beiden homologen Entsprechungen KC und Mip-2.

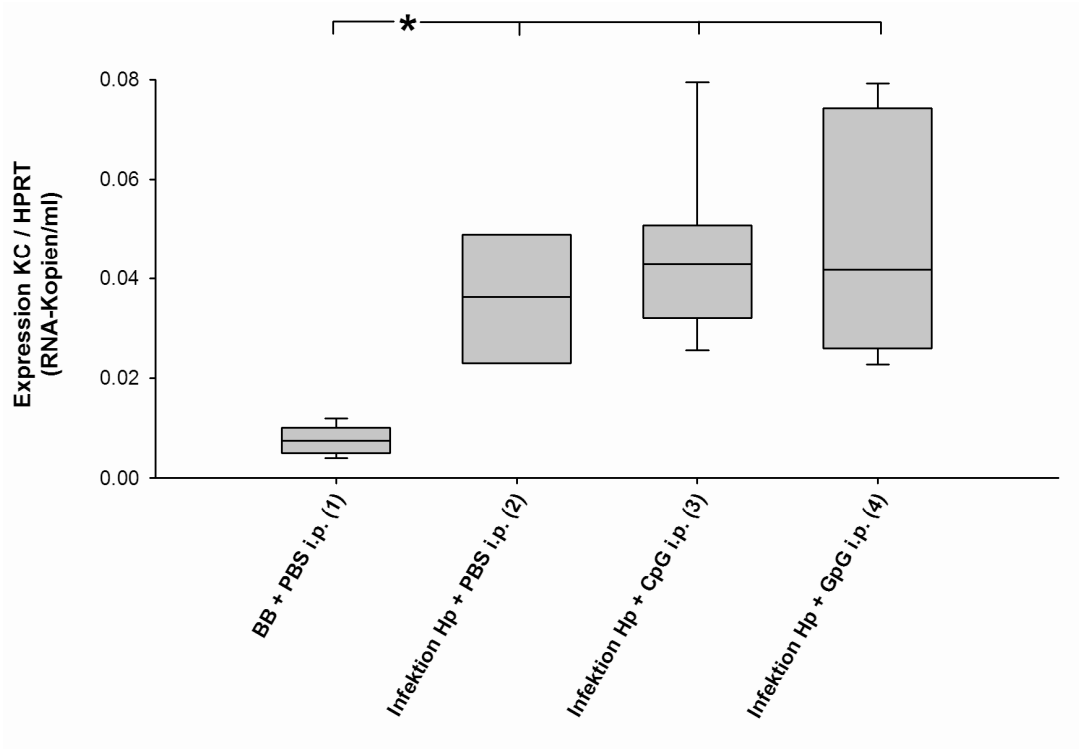


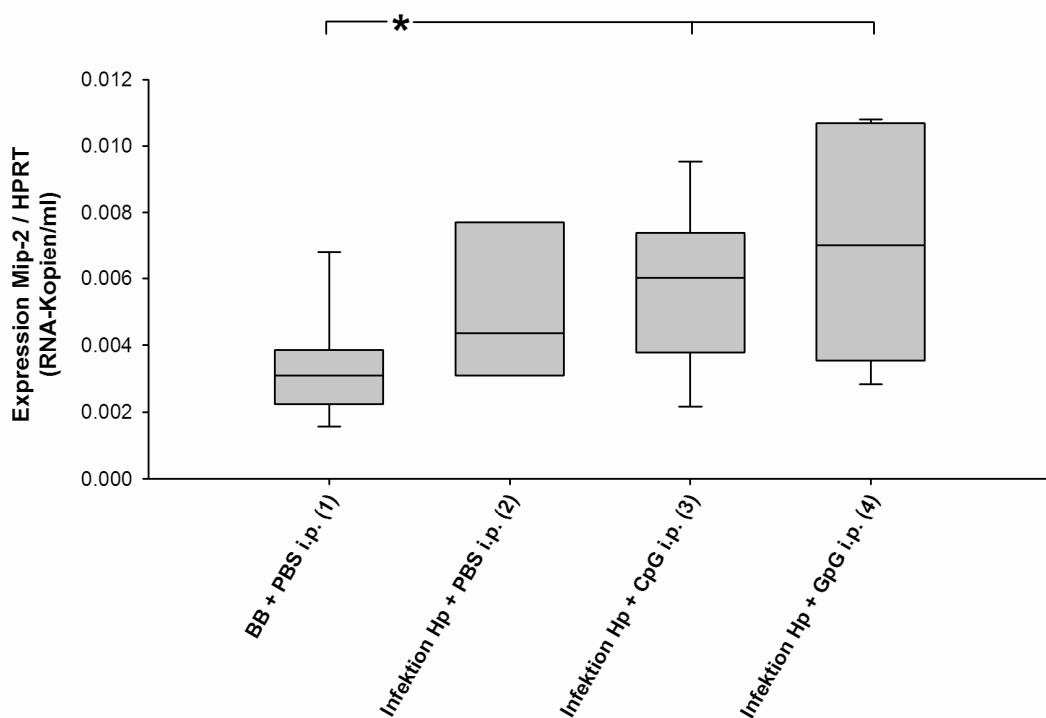
Abbildung 16: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von KC im Magengewebe



Im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) konnte in allen mit *H. pylori* infizierten Versuchsgruppen (2, 3, 4) eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression des Chemokins KC beobachtet werden. Die Verabreichung von CpG- oder GpG-ODNs (3, 4) führte dabei zu keiner signifikanten Veränderung der RNA-Expression im Vergleich zur Infektion mit *H. pylori* (2).

\* = RNA-Expression signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1),  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=9$  bzw. 8 für Gruppe (2)

Die starke RNA-Expression von KC konnte, wie in Abbildung 16 gezeigt, im Gegensatz zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) statistisch signifikant in allen infizierten Gerbils beobachtet werden (2, 3, 4). Dabei hatte nur die Infektion mit *H. pylori* (2) einen Einfluss auf die Veränderung der RNA-Expression, nicht jedoch die Injektion von CpG- (3) oder GpG-ODNs (4).

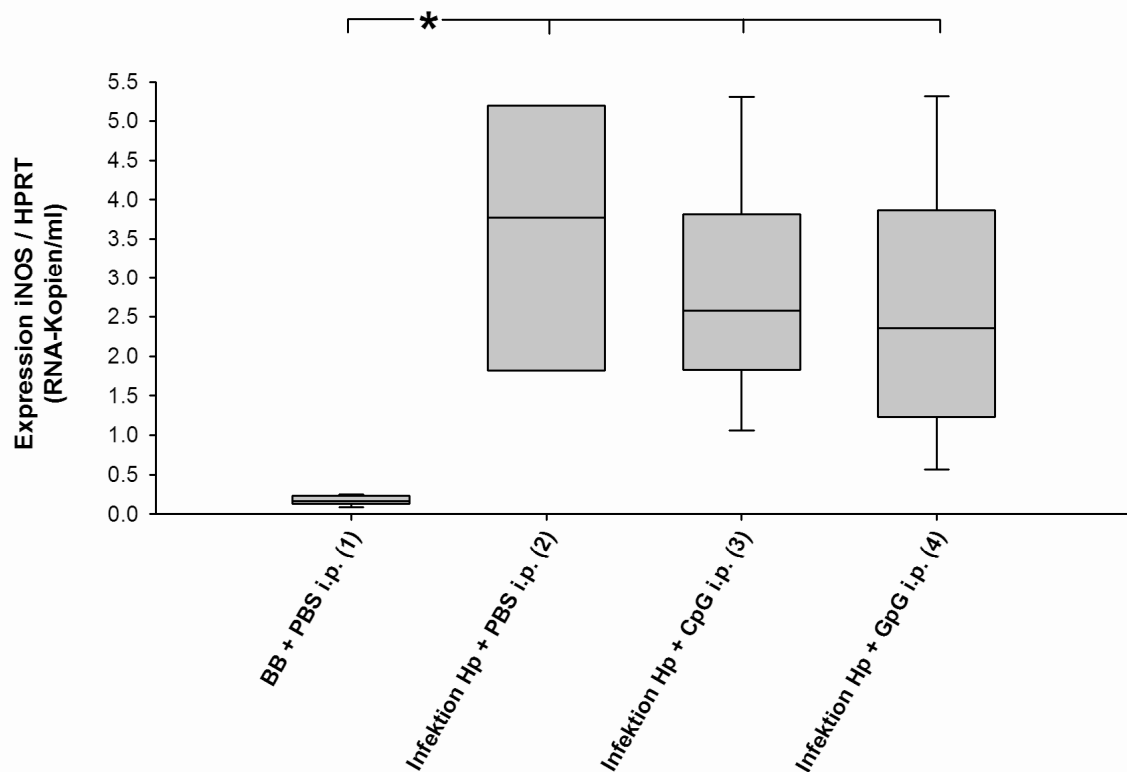


**Abbildung 17: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von Mip-2 im Magengewebe**

Eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression des Chemokins Mip-2 konnte im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) nur in den mit CpG- oder GpG-ODNs behandelten Versuchsgruppen (3, 4) beobachtet werden. Eine alleinige Infektion mit *H. pylori* ohne Injektion von ODNs führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner signifikanten Steigerung der RNA-Expression.

\* = RNA-Expression signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1),  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=9$  bzw. 8 für Gruppe (2)

Abbildung 17 zeigt die statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression von Mip-2 nach Injektion von CpG- und GpG-ODNs (3, 4) im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1). Es konnte dabei kein Unterschied in der RNA-Expression zwischen der Gabe von CpG- (3) oder GpG-ODN (4) festgestellt werden. Im Gegensatz dazu kam es bei einer Infektion mit *H. pylori* allein zu einem schwachen, jedoch nicht statistisch signifikanten Anstieg der RNA-Expression.



**Abbildung 18: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von iNOS im Magengewebe**

Im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) konnte in allen mit *H. pylori* infizierten Versuchsgruppen (2, 3, 4) eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression von iNOS beobachtet werden. Die Verabreichung von CpG- oder GpG-ODNs (3, 4) führte dabei zu keiner Veränderung der RNA-Expression im Vergleich zur Infektion mit *H. pylori* (2).

\* = RNA-Expression signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1),  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=9$  bzw. 8 für Gruppe (2)

Das Enzym iNOS ist ein wichtiger Bestandteil der initialen Immunantwort. Es katalysiert die Bildung eines freien Radikals und führt durch den dadurch ausgelösten nitrosativen Stress zu zellpathologischen Effekten mit bakterizider Wirkung. Wie in Abbildung 18 gezeigt, konnte die starke RNA-Expression von

iNOS im Gegensatz zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) statistisch signifikant in allen infizierten Gerbils beobachtet werden (2, 3, 4). Dabei hatte die Injektion von CpG- (3) oder GpG-ODNs (4) keinen Einfluss auf die Veränderung der RNA-Expression im Vergleich zur Infektion mit *H. pylori* (2).

#### 5.2.2.4.4 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Sie dienen der Erkennung von PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*); dabei handelt es sich um konservierte Strukturen, die ausschließlich bei Krankheitserregern vorkommen. Nach der Erkennung steuern TLRs die entsprechende Aktivierung von Genen zur Einleitung und Modulation einer adaptiven Immunantwort. In dieser Arbeit konnte zum Zeitpunkt vier Wochen nach Infektion der Gerbils mit *H. pylori* im Vergleich zu den Kontrollgruppen in keiner der infizierten und behandelten Gruppen eine statistisch signifikant gesteigerte RNA-Expression von TLR2 oder TLR5 nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5).

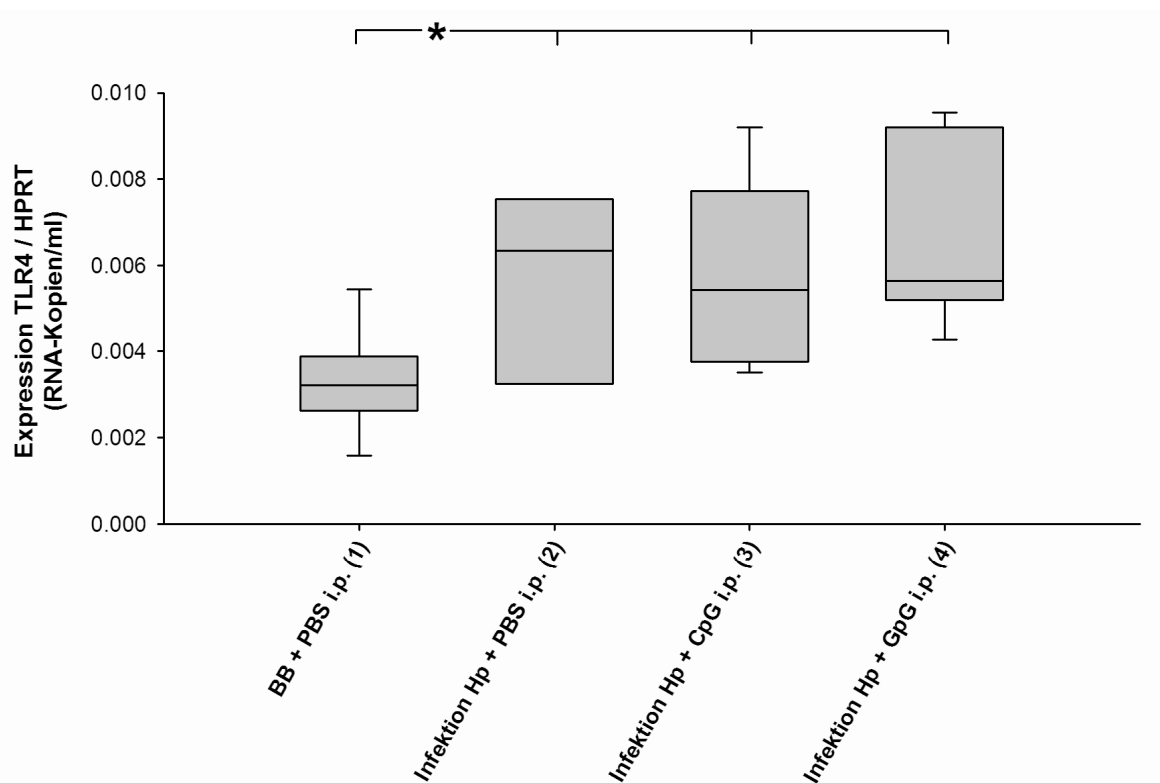
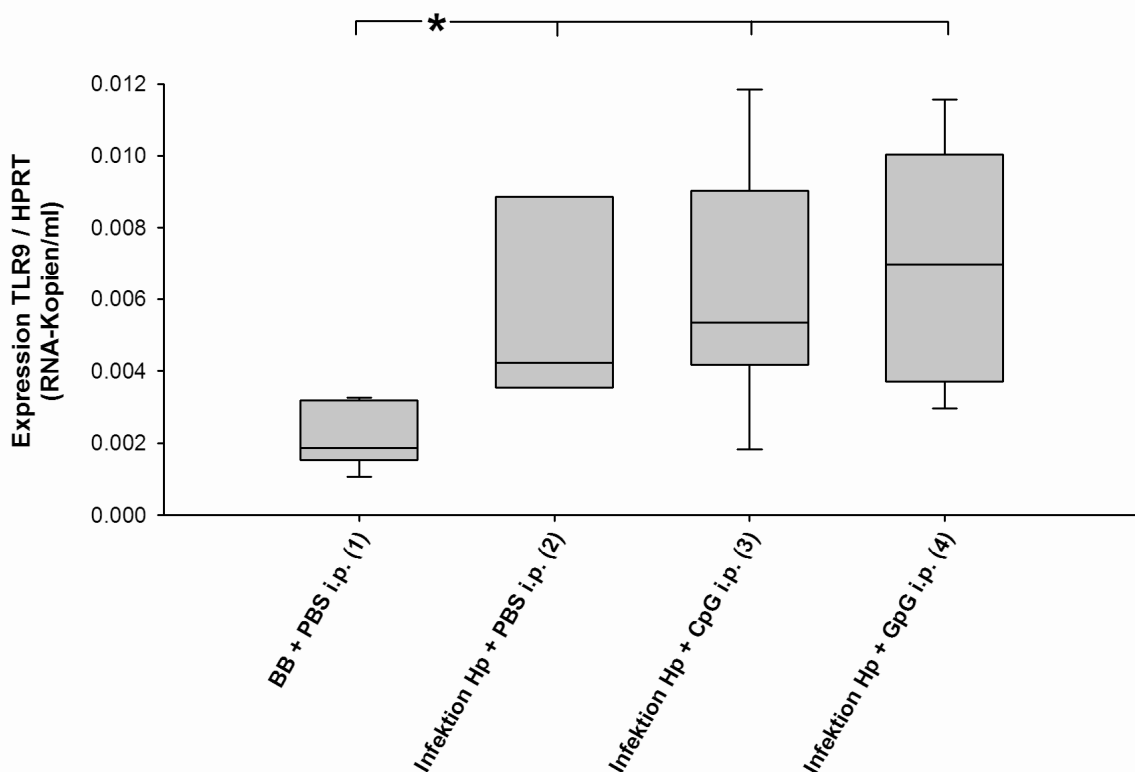


Abbildung 19: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von TLR4 im Magengewebe

In allen mit *H. pylori* infizierten Versuchsgruppen (2, 3, 4) konnte im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) eine stark erhöhte RNA-Expression von TLR4 beobachtet werden. Die Verabreichung von CpG- oder GpG-ODNs (3, 4) führte dabei zu keiner signifikanten Veränderung der RNA-Expression im Vergleich zur Infektion mit *H. pylori* (2).

\* = RNA-Expression signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1),  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=9$  bzw. 8 für Gruppe (2)

Wie in Abbildung 19 gezeigt, konnte die RNA-Expression von TLR4 im Gegensatz zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) statistisch signifikant in allen infizierten Gerbils beobachtet werden (2, 3, 4). Dabei hatte die Injektion von CpG- (3) oder GpG-ODNs (4) im Vergleich zur Infektion mit *H. pylori* (2) keinen Einfluss auf die Veränderung der RNA-Expression.



**Abbildung 20: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von TLR9 im Magengewebe**

Im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) konnte in allen mit *H. pylori* infizierten Versuchsgruppen (2, 3, 4) eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression von TLR4 beobachtet werden. Dabei führte nur die Infektion mit *H. pylori* (2) zu einer Veränderung der RNA-Expression, nicht jedoch die Verabreichung von CpG- (3) oder GpG-ODNs (4).

\* = RNA-Expression signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1),  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=9$  bzw. 8 für Gruppe (2)

In allen infizierten Gerbils (2, 3, 4) konnte, wie in Abbildung 20 gezeigt, im Gegensatz zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression von TLR9 beobachtet werden. Die Injektion von CpG- (3) oder GpG-ODNs (4) hatte keinen Einfluss auf die Veränderung der RNA-Expression im Vergleich zur Infektion mit *H. pylori* (2).

#### 5.2.2.4.5 Übersicht und Zusammenfassung: RNA-Expressionsprofil des Magens

	BB + PBS i.p. (1)	Infektion Hp + PBS i.p. (2)	Infektion Hp + CpG i.p. (3)	Infektion Hp + GpG i.p. (4)
<b>Proinflammatorische Zytokine</b>				
IFN- $\gamma$	-	*	*	*
IL-6	-	-	*	*
IL-1 $\beta$	-	*	*	*
TNF	-	-	*	*
IL-12p35	-	-	-	-
IL-12p40	-	-	-	-
IL-18	-	-	*	*
MIF	-	-	-	*
<b>Antiinflammatorische Zytokine</b>				
IL-4	-	-	-	-
IL-10	-	-	-	-
<b>Chemokine und iNOS</b>				
KC	-	*	*	*
Mip-2	-	-	*	*
iNOS	-	*	*	*
<b>Toll-like Rezeptoren</b>				
TLR2	-	-	-	-
TLR4	-	*	*	*
TLR5	-	-	-	-
TLR9	-	*	*	*

**Tabelle 6: Übersicht RNA-Expressionsprofil des Magens**

Übersicht über die Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, iNOS, Chemokinen und TLRs im Magengewebe.

- = Expression nicht statistisch signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1)

\* = Expression statistisch signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1)

Wie in Tabelle 6 gezeigt, wurde in allen infizierten Gerbils eine gesteigerte Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF und IL-18 im Magen beobachtet. Eine erhöhte Expression von IL-12 (p35 und p40 Untereinheit) konnte im Gegensatz zur nicht-infizierten Kontrolle nicht nachgewiesen werden, ebenso wenig wie die für eine Th2-Immunantwort wichtigen, antiinflammatorisch wirksamen Zytokine IL-4 und IL-10. Die RNA-Produktion von iNOS war durch die Infektion mit *H. pylori* stark gesteigert und spricht damit für erhöhten nitrosativen Stress. Die beiden Chemokine KC und Mip-2, murine Homologe für IL-8, zeigten ebenfalls eine verstärkte Expression in infizierten Tieren. Eine gesteigerte RNA-Expression von TLR2 und TLR5 konnte im Magengewebe nicht nachgewiesen werden, im Gegensatz zu TLR4 und TLR9, welche in infizierten Gerbils verstärkt exprimiert wurden.

Somit hatte eine Infektion mit *H. pylori* starken Einfluss auf das Expressionsprofil im Magengewebe und führte zu einer gesteigerten Expression vor allem von proinflammatorisch wirksamen Proteinen. Durch die Verabreichung von CpG-ODN sollte diese Th1-geprägte Immunantwort weiter gesteigert werden, während eine Injektion von GpG-ODN eine Suppression bewirken sollte. In diesem Versuchsteil zeigte sich durch den Einsatz beider ODNs eine gesteigerte RNA-Expression proinflammatorischer Zytokine im Magengewebe im Vergleich zu nur mit *H. pylori* infizierten Tieren. Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke zwischen dem Einsatz von CpG- oder GpG-ODNs festgestellt werden.

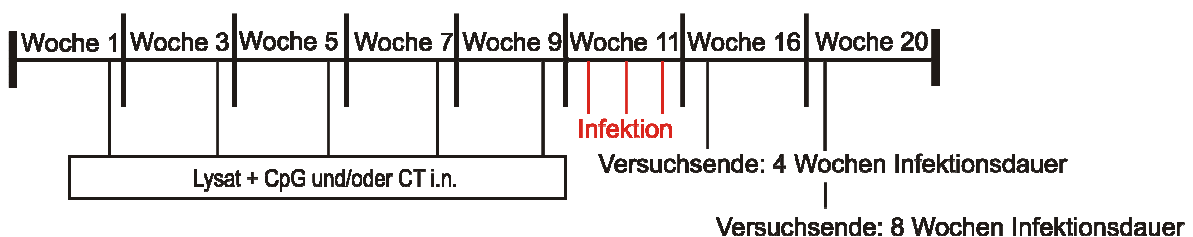
## Modulation der *H. pylori*-induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen

Eine Infektion mit *H. pylori* resultiert in einer Th1-dominanten Reaktion des Immunsystems, welche aber zu keiner erfolgreichen Eradikation des Bakteriums führt. Dadurch wird dem Bakterium, auch beeinflusst von bakteriellen Faktoren, die Kolonisierung des Magens ermöglicht. Eine Verstärkung der Th1-geprägten Reaktion des Immunsystems könnte dabei zu einer erfolgreichen Eradikation von *H. pylori* führen. In der Arbeit von Sommer et al. konnte durch eine Immunisierung von Mäusen mit *H. pylori*-Lysat und CpG-ODN als Adjuvanz eine starke lokale und systemische Th1-Immunantwort hervorgerufen werden (Sommer et al., 2004).

Möglicherweise wird das Immunsystem durch bakterielle Faktoren in die komplett falsche Richtung geführt, um *H. pylori* ein Überleben im Magen zu ermöglichen. Somit könnte eine Th-2-geprägte Immunantwort zu einer Eradikation des Bakteriums im Magen führen, wobei Cholera-Toxin als starkes Th2-Adjuvanz bekannt ist.

Eine Kombination aus Lysat und CpG-ODN sollte also zu einer Verstärkung der proinflammatorischen Immunreaktion gegen *H. pylori* führen, wohingegen bei einem Einsatz von Cholera-Toxin der regulatorische Effekt einer Th2-Immunantwort vorherrschend wäre. In Mäusen konnte durch die Kombination von Lysat, CpG-ODN und Cholera-Toxin ein protektiver und synergistischer Effekt der Immunaktivierung beobachtet werden, der zu einem Schutz vor *H. pylori* führte (Jiang et al., 2003). Die Wirksamkeit einer Immunmodulation durch die Kombination der Immunisierungsstrategien Lysat, CpG-ODN und Cholera-Toxin sollte nun in dieser Arbeit im Gerbil-Modell der *H. pylori*-Infektion weiter untersucht werden.

### Zeitlicher Ablauf:





**Gruppenaufteilung:**

Gruppe (1): BB + PBS i.n. => keine Infektion, keine Behandlung

Gruppe (2): Infektion Hp + PBS i.n. => Infektion, keine Behandlung

Gruppe (3): Infektion Hp + Lysat/CpG i.n. => Infektion + Immunisierung mit *H. pylori* Lysat/CpG-Kombination

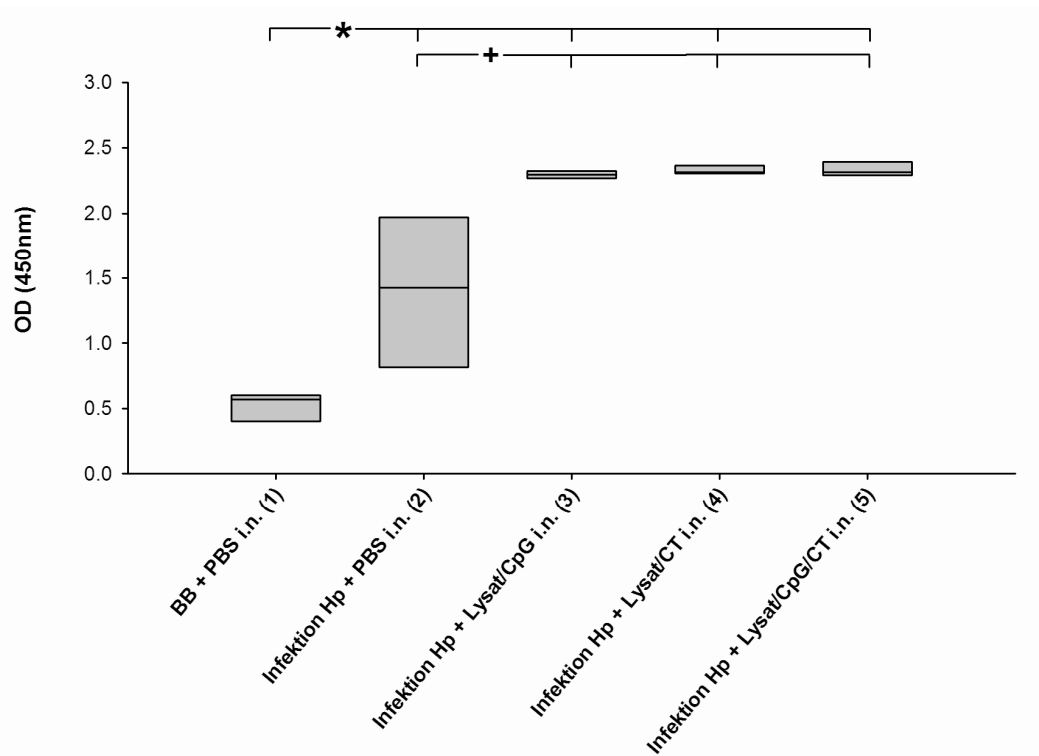
Gruppe (4): Infektion Hp + Lysat/CT i.n. => Infektion + Immunisierung mit *H. pylori* Lysat/CT-Kombination

Gruppe (5): Infektion Hp + Lysat/CpG/CT i.n. => Infektion + Immunisierung mit *H. pylori* Lysat/CpG/CT-Kombination

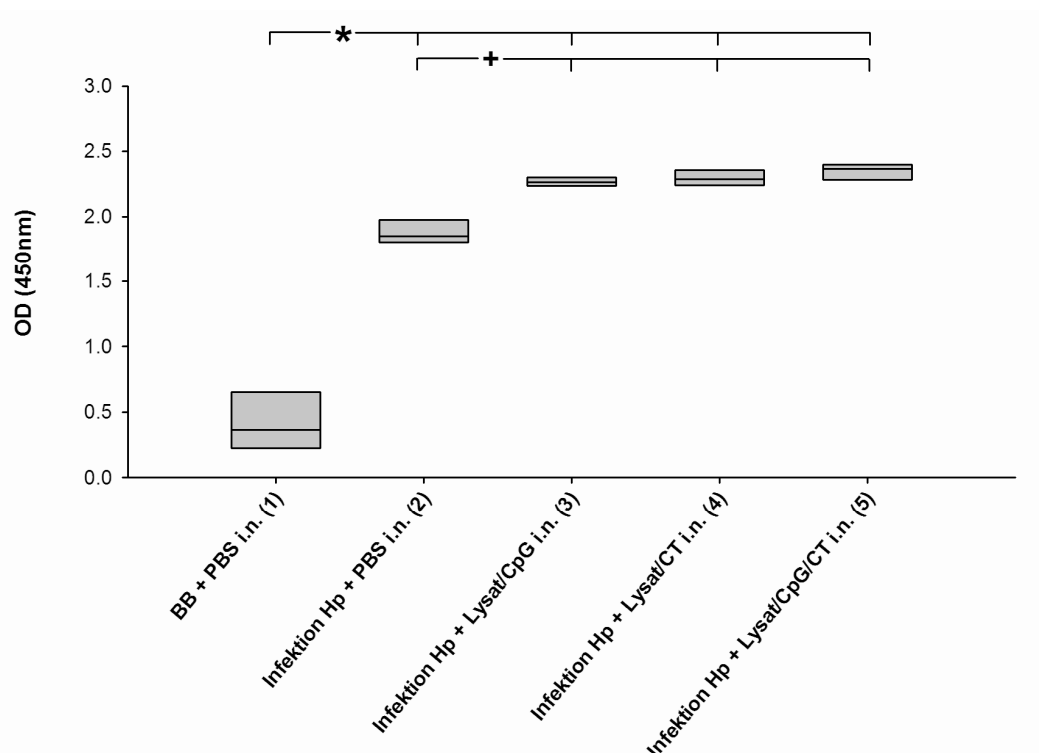
Der zeitliche Versuchsablauf gestaltete sich wie folgt: Die Kombination aus *H. pylori* Lysat + CpG-ODN, *H. pylori* Lysat + Cholera-Toxin und *H. pylori* Lysat + CpG-ODN + Cholera-Toxin wurde insgesamt fünfmal mit wöchentlichem Abstand durch eine intranasale Injektion verabreicht. Danach wurden die Tiere mit *H. pylori* infiziert. Die beiden Kontrollgruppen (1, 2) erhielten eine intranasale Injektion mit PBS, Gruppe (2) wurde zusätzlich als Infektionskontrolle mit *H. pylori* infiziert. Das Experiment war in zwei Großgruppen geteilt, wovon ein Teil nach vier, der andere nach acht Wochen Infektionsdauer beendet wurde. Die Versuche wurden jeweils zwei Mal zu unterschiedlichen Zeitpunkten und voneinander unabhängig durchgeführt.

**5.2.3 Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die *H. pylori*-induzierte Bildung spezifischer Antikörper nach vier und acht Wochen**

## 4 Wochen



## 8 Wochen



**Abbildung 21: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die *H. pylori*-induzierte Bildung spezifischer Antikörper nach vier und acht Wochen**

Die Bestimmung des *H. pylori*-spezifischen Antikörpertiters erfolgte durch den Nachweis von Immunglobulin G mithilfe eines ELISA's. Dieses Protein diente sowohl zur Analyse der durch das

Bakterium induzierten Immunantwort, als auch zur Überprüfung der experimentellen Infektionseffizienz. Während sich in der nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) eine unspezifische Reaktion von Immunglobulin G zeigte, konnte in allen infizierten Gruppen (2, 3, 4, 5) eine statistisch signifikante Erhöhung von *H. pylori*-spezifischem Immunglobulin G nachgewiesen werden. Durch die Immunisierung mit Lysat (3, 4, 5) wurde bei allen Gerbils, egal ob nach vier oder acht Wochen Infektionsdauer und auch unabhängig vom verwendeten Adjuvanz, eine im Vergleich zur infizierten Kontrollgruppe (2) nochmals verstärkte Produktion *H. pylori*-spezifischer Antikörper beobachtet. Während eine alleinige Infektion mit dem Bakterium nach vier Wochen Infektionsdauer zu Werten mit einer starken Streubreite führte, hatte sich der hohe *H. pylori*-spezifische Antikörpertiter nach acht Wochen stabilisiert.

\* = nicht-infiziert (1) vs. infiziert (2, 3, 4, 5); + = infiziert/nicht-immunisiert (2) vs. infiziert/immunisiert (3, 4, 5);  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=6$  jeweils für vier und acht Wochen

Abbildung 21 zeigt die Entwicklung von *H. pylori*-spezifischem Immunglobulin G über einen Infektionszeitraum von vier und acht Wochen nach Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen. In der nicht-infizierten Kontrollgruppe, die nur eine Injektion mit PBS (1) erhielt, konnte eine unspezifische Reaktion von Immunglobulin G beobachtet werden. Im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) kam es bei allen infizierten Gerbils (2, 3, 4, 5) zu einer statistisch signifikant erhöhten Produktion von *H. pylori*-spezifischen Antikörpern. Durch die Immunisierung mit Lysat (3, 4, 5) konnte der bereits hohe Antikörpertiter zum Zeitpunkt vier Wochen nach Infektion gegenüber den infizierten Tieren (2) nochmals gesteigert werden. Während eine alleinige Infektion mit *H. pylori* (2) nach vier Wochen Infektionsdauer zu Werten mit einer starken Streubreite führte, hatte sich der *H. pylori*-spezifische Antikörperspiegel nach acht Wochen stabilisiert, erreichte aber trotzdem nicht das Niveau der Immunisierung mit Lysat. Die verwendeten Adjuvanzen CpG-ODN und Cholera-Toxin hatten auf die Ausprägung des Antikörpertiters keinen Effekt.

#### 5.2.4 PCR-Nachweis von *H. pylori*-DNA im Magengewebe

Der Nachweis von *H. pylori*-DNA im Magengewebe erfolgte mithilfe einer quantitativen PCR. Dabei wurde ein charakteristischer Bereich des Urease-Gens amplifiziert. Diese Methode diente zur Kontrolle der Infektionseffizienz, eine quantitative Bestimmung der Bakterienlast war in diesem Versuchsaufbau

aufgrund der fehlenden Normalisierung mit einem konstitutiv exprimierten Gen nicht möglich.

	BB + PBS i.n. (1)	Infektion Hp + PBS i.n. (2)	Infektion Hp + Lysat/CpG i.n. (3)	Infektion Hp + Lysat/CT i.n. (4)	Infektion Hp + Lysat/CpG/CT i.n. (5)
Gesamtanzahl Gerbils	6	6	6	6	6
DNA-Nachweis positiv	0	5	5	5	6
DNA-Nachweis negativ	6	1	1	1	0

**Tabelle 7: PCR-Nachweis von *H. pylori*-DNA im Magengewebe nach vier Wochen Infektionsdauer**

	BB + PBS i.n. (1)	Infektion Hp + PBS i.p. (2)	Infektion Hp + Lysat/CpG i.n. (3)	Infektion Hp + Lysat/CT i.n. (4)	Infektion Hp + Lysat/CpG/CT i.n. (5)
Gesamtanzahl Gerbils	5	6	6	6	6
DNA-Nachweis positiv	0	6	6	5	6
DNA-Nachweis negativ	5	0	0	1	0

**Tabelle 8: PCR-Nachweis von *H. pylori*-DNA im Magengewebe nach acht Wochen Infektionsdauer**

Der PCR-Nachweis von *H.pylori*-DNA im Magengewebe erfolgte durch die Amplifizierung eines charakteristischen Bereichs des Urease-Gens. Eine quantitative Bestimmung der Bakterienlast war mit dieser Methode nicht möglich, es handelte sich lediglich um eine Kontrolle der Infektionseffizienz.

In allen nicht-infizierten Gerbils konnten nach vier und acht Wochen Infektionsdauer keine *H. pylori*-DNA im Magengewebe amplifiziert werden. Bei den infizierten Tieren gab es Einzelfälle, in denen es nicht zu einer dauerhaften Kolonisierung des Magens durch *H. pylori* gekommen ist.

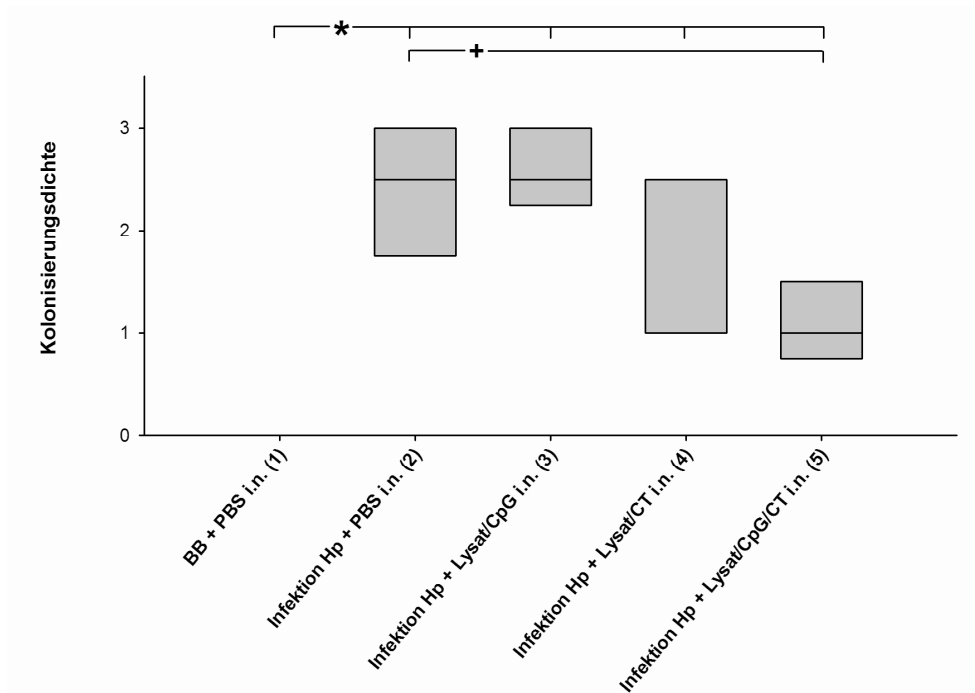
In den Tabellen 7 und 8 ist die Gesamtzahl der Gerbils den positiven oder negativen Nachweisergebnissen von *H. pylori*-DNA aus dem Magen nach vier und acht Wochen Infektionsdauer gegenübergestellt. In allen nicht-infizierten

Kontrolltieren konnte keine DNA des Bakteriums aus dem Magengewebe amplifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnte nach vier Wochen in manchen Fällen bei infizierten Tieren keine dauerhafte Kolonisierung des Magens durch *H. pylori* nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt vier Wochen nach Infektion wurde eine erfolgreiche Infektion mit *H. pylori* bei 21 von 24 Gerbils festgestellt, nach acht Wochen waren es 23 von insgesamt 24 infizierten Tieren.

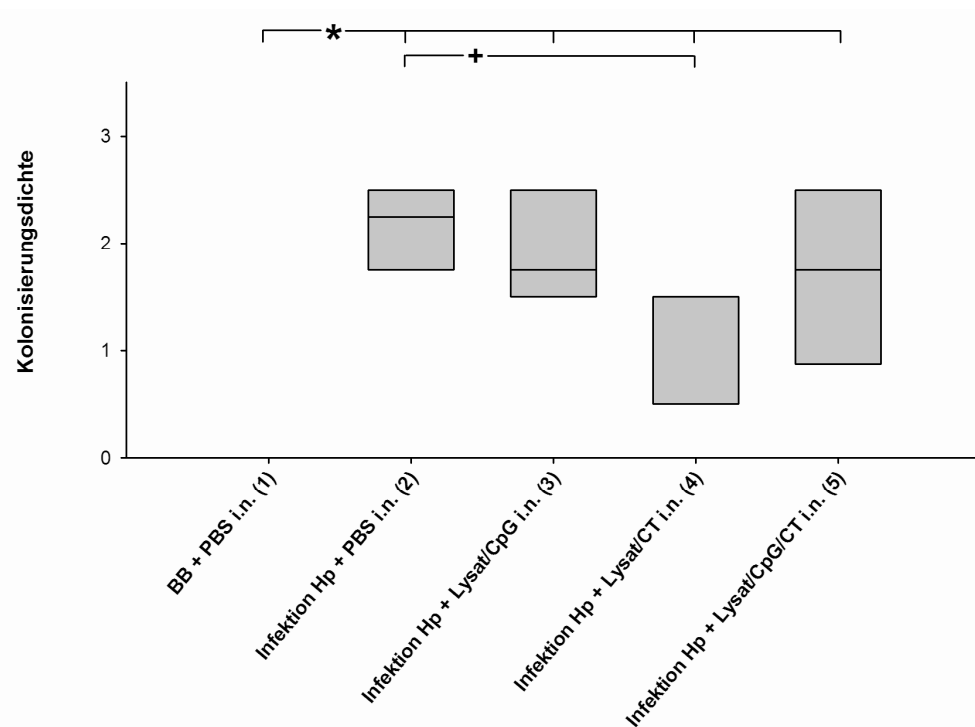
#### **5.2.5 Anzuchtversuch und Analyse der Kolonisierungsdichte**

In der Arbeit von Jiang et al. konnte bei Mäusen durch eine kombinierte Immunisierung aus Lysat, CpG-ODN und Cholera-Toxin eine sterile Immunität gegen die Infektion mit *H. pylori* erreicht werden (Jiang et al., 2003). Deshalb wurde für dieses Experiment zusätzlich zu den bereits genannten Analyseverfahren ein Anzuchtversuch von *H. pylori* aus dem Magen zur Feststellung der Kolonisierungsdichte durchgeführt. Nachdem vom Magen alle Streifen für die histologische Untersuchung, den Nachweis von *H. pylori*-DNA und die Erstellung eines RNA-Expressionsprofils entfernt waren, wurde der Rest in PBS homogenisiert und auf Platten mit einer selektiven Antibiotikamischung ausgebracht. Das Wachstum der begleitenden bakteriellen Magenflora wurde dadurch unterdrückt und nach einigen Tagen Inkubation konnte schließlich das Wachstum der *H. pylori*-Kolonien überprüft werden.

## 4 Wochen



## 8 Wochen



**Abbildung 22: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die Kolonisierungsdichte von *H. pylori* im Magen nach vier und acht Wochen**

Der Gerbil-Magen wurde mit PBS homogenisiert, ausplattiert und für einige Tage inkubiert. Das Wachstum wurde in Kategorien eingeteilt: Von 0, d.h. kein Wachstum, bis zu 3, d.h. ein geschlossener Bakterienrasen. In der nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) wurde in keinem Fall ein Wachstum von *H. pylori* beobachtet. Im Vergleich dazu konnte bei allen infizierten Tieren (2, 3, 4,

5) eine statistisch signifikant gesteigerte Anzahl von Kolonien nachgewiesen werden. Obwohl durch den kombinierten Einsatz von Lysat/CpG/CT (5) nach vier Wochen eine Reduktion der Keimzahl beobachtet werden konnte, war dieser Effekt nach acht Wochen nicht mehr sichtbar.

\* = nicht-infiziert (1) vs. infiziert (2, 3, 4, 5); + = infiziert/nicht-immunisiert (2) vs. infiziert/immunisiert (3, 4, 5);  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=6$  jeweils für vier und acht Wochen

Ein genaues Auszählen der Bakterienkolonien war nicht möglich, da sich auf den Agarplatten noch Gewebereste des Magens befanden und die Kolonien durch die notwendige lange Inkubationszeit nicht mehr voneinander abgrenzbar waren. Deshalb erfolgte eine Einteilung des Bakterienwachstums in Kategorien. Dies gestaltete sich wie folgt:

0: keine Kolonien

1: vereinzelt Wachstum

2: zahlreiche Kolonien

3: Bakterienrasen

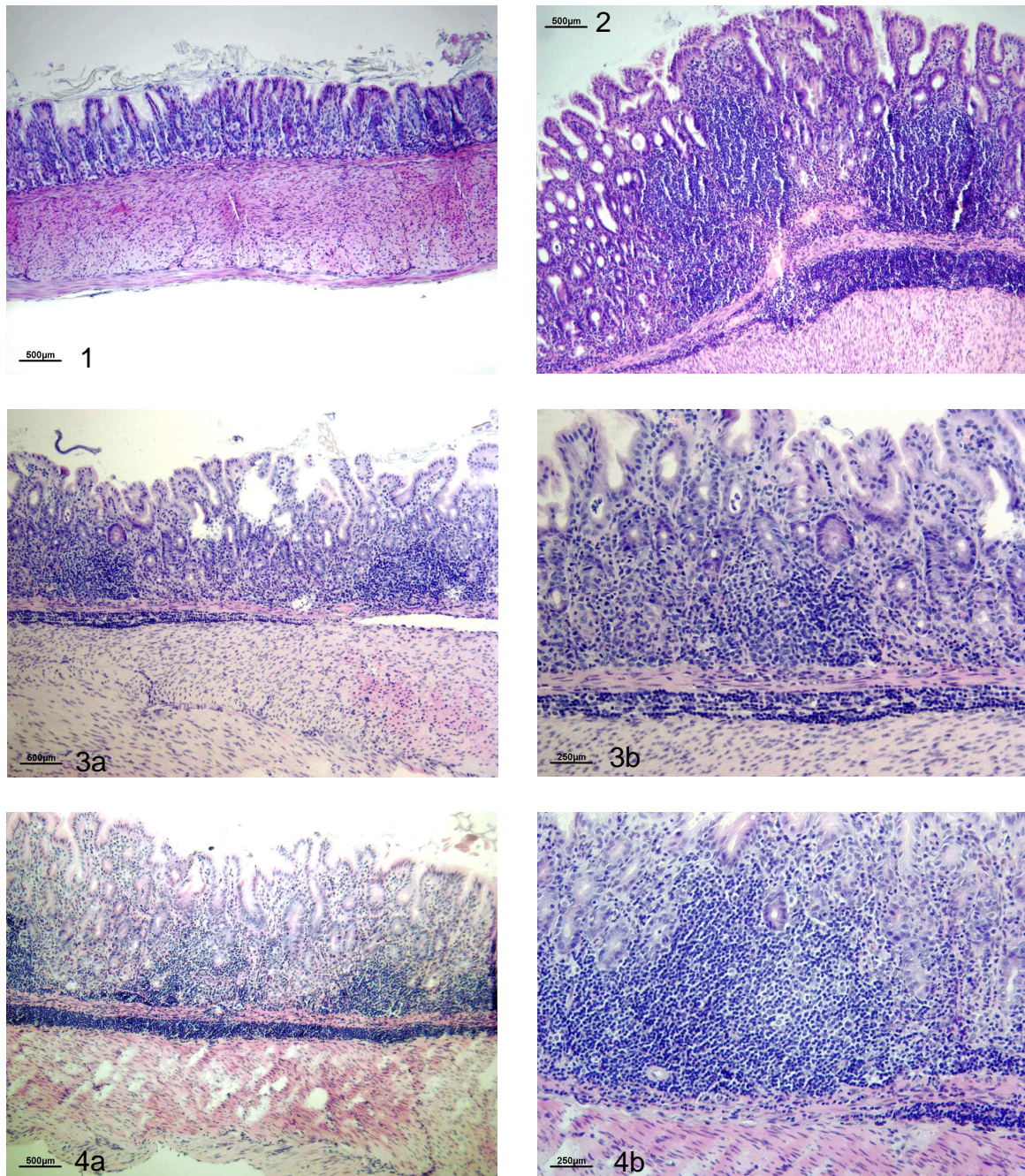
Wie in Abbildung 22 gezeigt konnte bei nicht-infizierten Tieren (1) in keinem Fall ein Wachstum von *H. pylori* beobachtet werden. Im Vergleich dazu wurde eine statistisch signifikant gesteigerte Anzahl von Kolonien in allen infizierten Tieren (2, 3, 4, 5) nachgewiesen. Durch den kombinierten Einsatz von Lysat/CpG/CT (5) konnte im Vergleich zur Infektionskontrolle (2) nach vier Wochen eine Reduktion der Keimzahl beobachtet werden. Dieser Effekt war jedoch nach acht Wochen nicht mehr sichtbar, im Gegensatz dazu zeigte sich hier bei der mit Lysat und Cholera-Toxin immunisierten Versuchsgruppe (4) ein reduziertes Wachstum von *H. pylori*. Hierbei handelte es sich höchstwahrscheinlich um einen unspezifischen Effekt und insgesamt konnte keine Verminderung der Kolonisierungsdichte von *H. pylori* beobachtet werden, die eindeutig auf eine der verwendeten Immunisierungskombinationen zurückzuführen wäre.

#### **5.2.6 Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die *H. pylori*-induzierte Histologie des Magens**

Eine Infektion mit *H. pylori* führt immer zu histopathologischen Veränderungen der Magenschleimhaut, die von der Infiltration von Entzündungszellen, über Gewebedysplasie bis hin zur Ausbildung von Ulcera oder sogar Karzinomen reichen.



## 4 Wochen



**Abbildung 23: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf *H. pylori*-induzierte Entzündungserscheinungen im Magen nach vier und acht Wochen (HE-Färbung)**

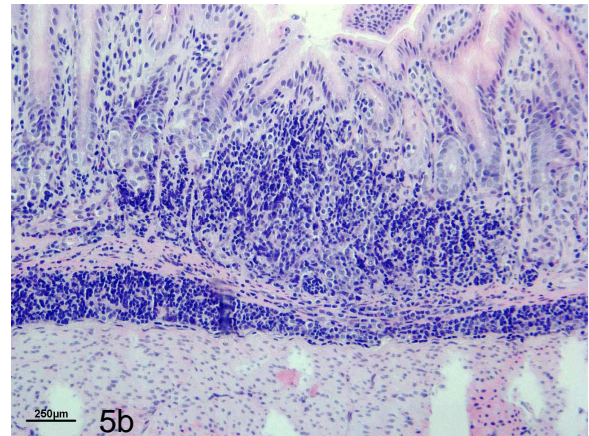
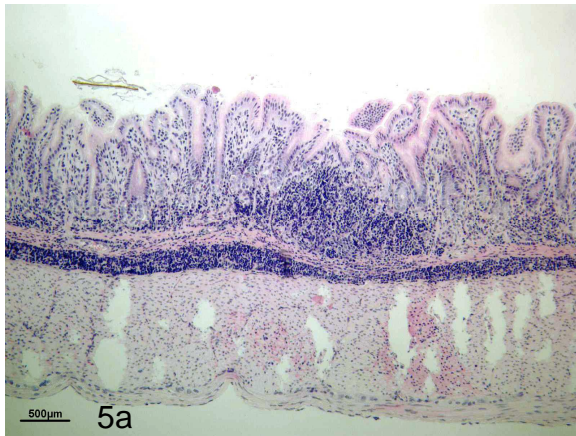
Gruppe (1): BB + PBS i.n. => Antrum, 100fache Vergrößerung

Gruppe (2): Infektion Hp + PBS i.n. => Antrum, 100fache Vergrößerung

Gruppe (3): Infektion Hp + Lysat/CpG i.n => 3a: Antrum, 100fache Vergrößerung; 3b: Lymphfollikel, 200fache Vergrößerung

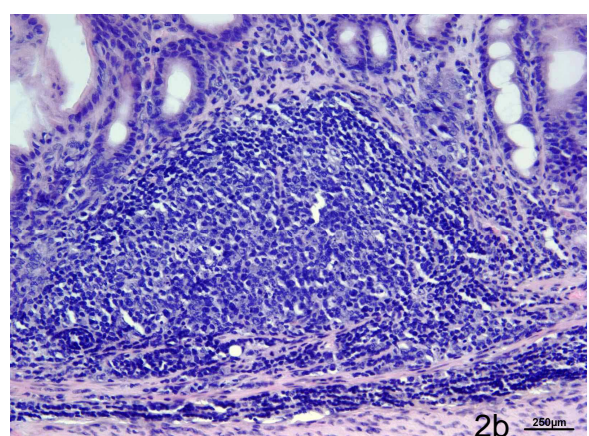
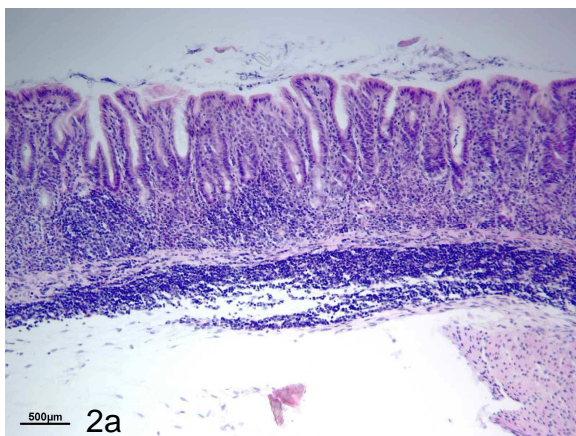
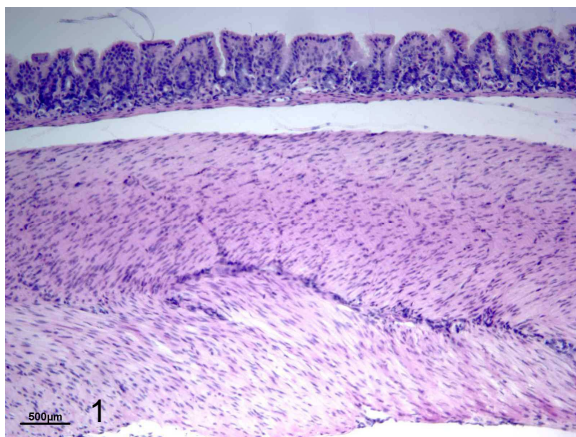
Gruppe (4): Infektion Hp + Lysat/CT i.n. => 4a: Antrum, 100fache Vergrößerung; 4b: Lymphfollikel, 200fache Vergrößerung





Gruppe (5): Infektion Hp + Lysat/CpG/CT i.n. => 5a: Antrum, 100fache Vergrößerung; 5b: Lymphfollikel, 200fache Vergrößerung

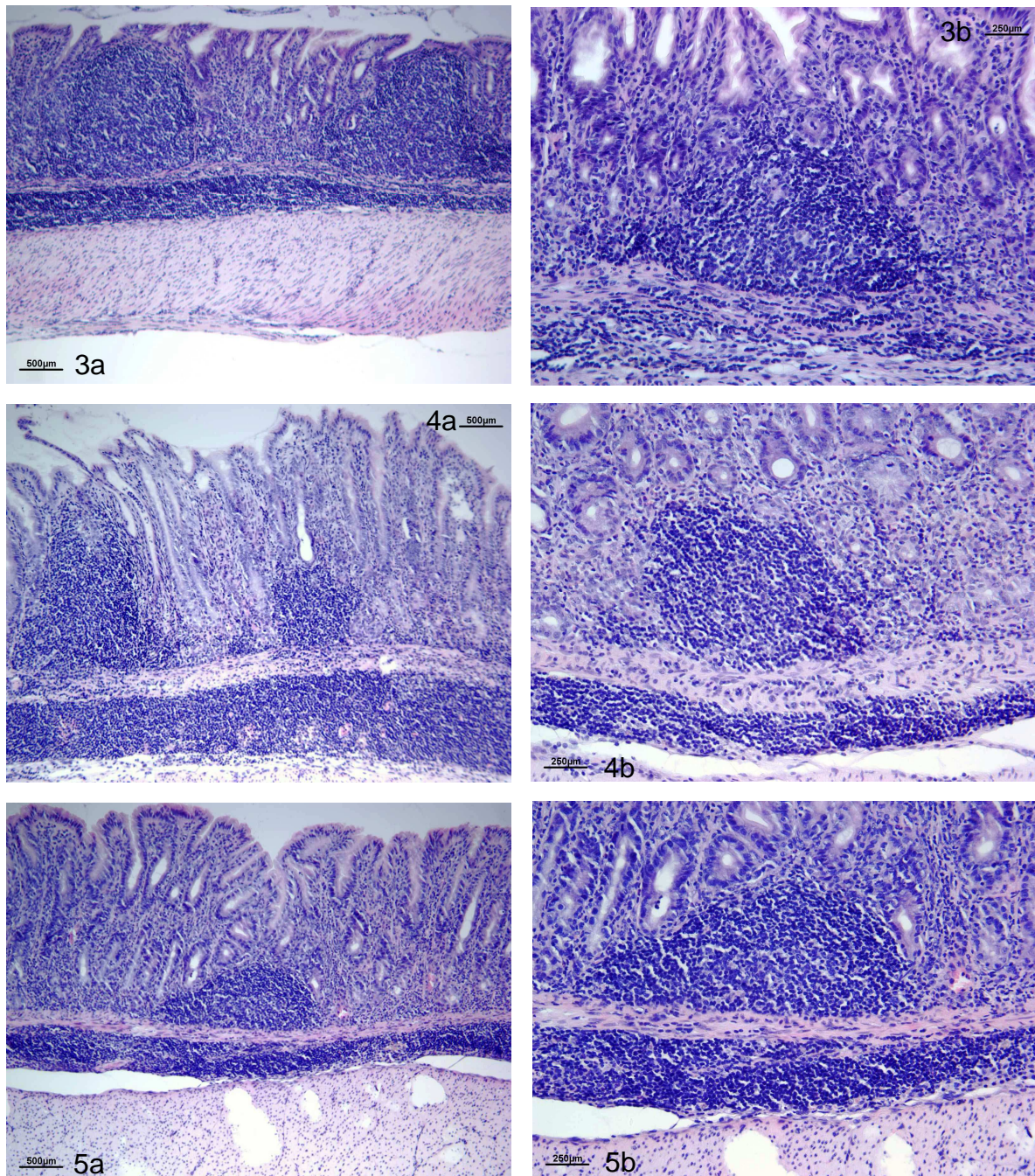
## 8 Wochen



Gruppe (1): BB + PBS i.n. => Antrum, 100fache Vergrößerung

Gruppe (2): Infektion Hp + PBS i.n. => 2a: Antrum, 100fache Vergrößerung; 2b: Lymphfollikel, 200fache Vergrößerung





Gruppe (3): Infektion Hp + Lysat/CpG i.n. => 3a: Antrum, 100fache Vergrößerung; 3b: Lymphfollikel, 200fache Vergrößerung

Gruppe (4): Infektion Hp + Lysat/CT i.n. => 4a: Antrum, 100fache Vergrößerung; 4b: Lymphfollikel, 200fache Vergrößerung

Gruppe (5): Infektion Hp + Lysat/CpG/CT i.n. => 5a: Antrum, 100fache Vergrößerung; 5b: Lymphfollikel, 200fache Vergrößerung

In der nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) konnten keine histopathologischen Veränderungen der Magenschleimhaut beobachtet werden. Alle mit *H. pylori* infizierten Gerbils (2, 3, 4, 5) zeigten hingegen eine ausgeprägte Infiltration von Entzündungszellen. Diese war nicht oberflächlich auf die Lamina beschränkt, sondern reichte bis in die Tiefe des Bindegewebes. In vielen Fällen konnte ein

regelrechtes „Band“ aus Entzündungszellen beobachtet werden, das sich in der *Tela submusosa* entlang zog. Auch Hyperplasie, Dysplasie und Lymphfollikel konnten in allen infizierten Gerbils nachgewiesen werden. Insgesamt wurde eine Verstärkung der Entzündungserscheinungen nach acht Wochen Infektionsdauer mit *H. pylori* im Vergleich zu vier Wochen beobachtet.

Der Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf *H. pylori*-induzierte Entzündungserscheinungen in der Magenschleimhaut nach vier und acht Wochen ist in Abbildung 23 gezeigt. Bei allen nicht-infizierten Tieren (1) konnten keine histopathologischen Veränderungen beobachtet werden. Mit *H. pylori* infizierte Gerbils (2, 3, 4, 5) zeigten bereits nach vier Wochen Infektionsdauer eine ausgeprägte Infiltration von Entzündungszellen, z.B. Lymphozyten. Die Infiltration beschränkte sich bei allen infizierten Gerbils nicht auf die Lamina, sondern reichte bis zur *Tela submucosa*. Auch Hyperplasie und Dysplasie konnten in den infizierten Tieren beobachtet werden. Während es sich bei der Dysplasie um eine Abweichung der Gewebestruktur vom Normalzustand handelt, sieht man bei der Hyperplasie im histologischen Bild eine Vergrößerung des Gewebes durch vermehrte Zellteilung. Bei etwa einem Großteil der Tiere konnten auch Lymphfollikel oder Vorstufen dazu im Magen beobachtet werden. Allgemein wurde eine Verstärkung der Entzündungserscheinungen im Magen nach acht Wochen Infektionsdauer mit *H. pylori* im Vergleich zu vier Wochen beobachtet.

#### **5.2.7 Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression im Magengewebe**

Eine Infektion mit *H. pylori* führt zu einer charakteristischen Expression von immunologisch aktiven Proteinen im Magengewebe. Durch das Erstellen eines detaillierten RNA-Expressionsprofils von wichtigen Zytokinen, Chemokinen und Oberflächenrezeptoren kann die durch das Bakterium ausgelöste Immunantwort besser charakterisiert werden.

### 5.2.7.1 RNA-Expressionsprofil nach vier Wochen Infektionsdauer

#### 5.2.7.1.1 Proinflammatorische Zytokine

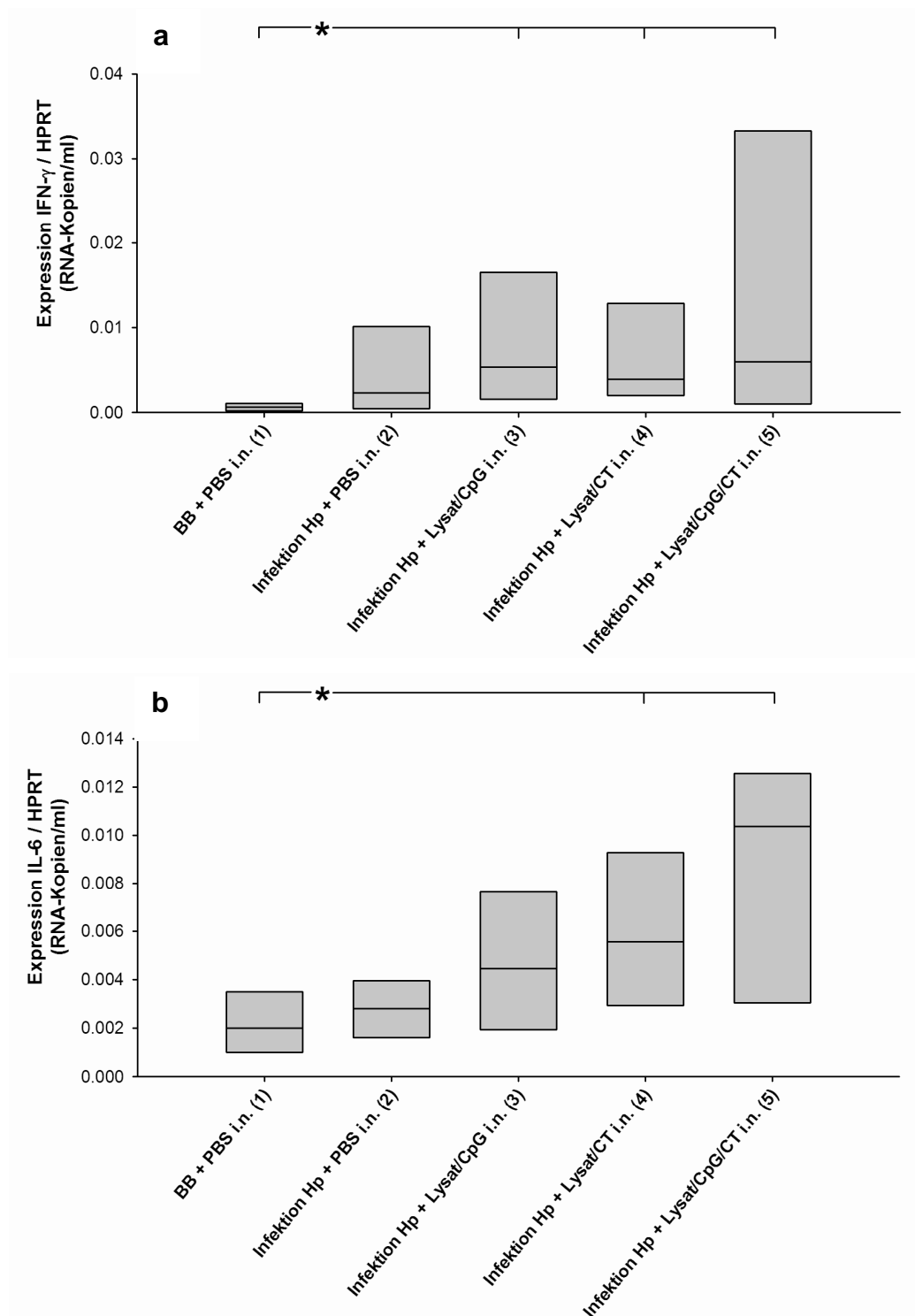
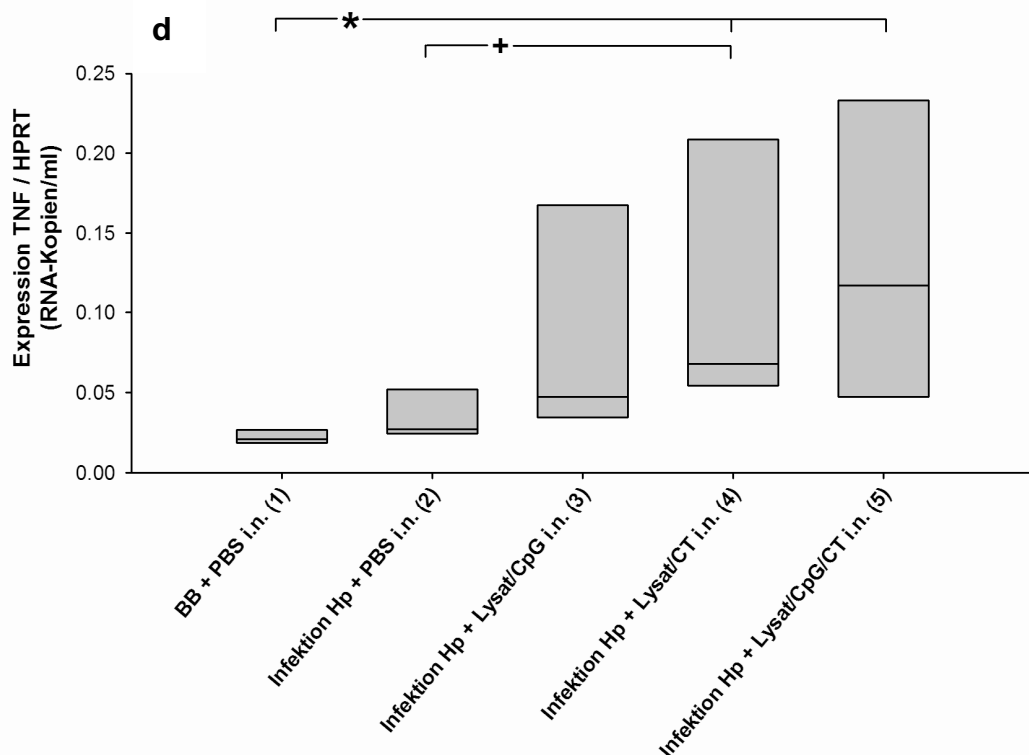
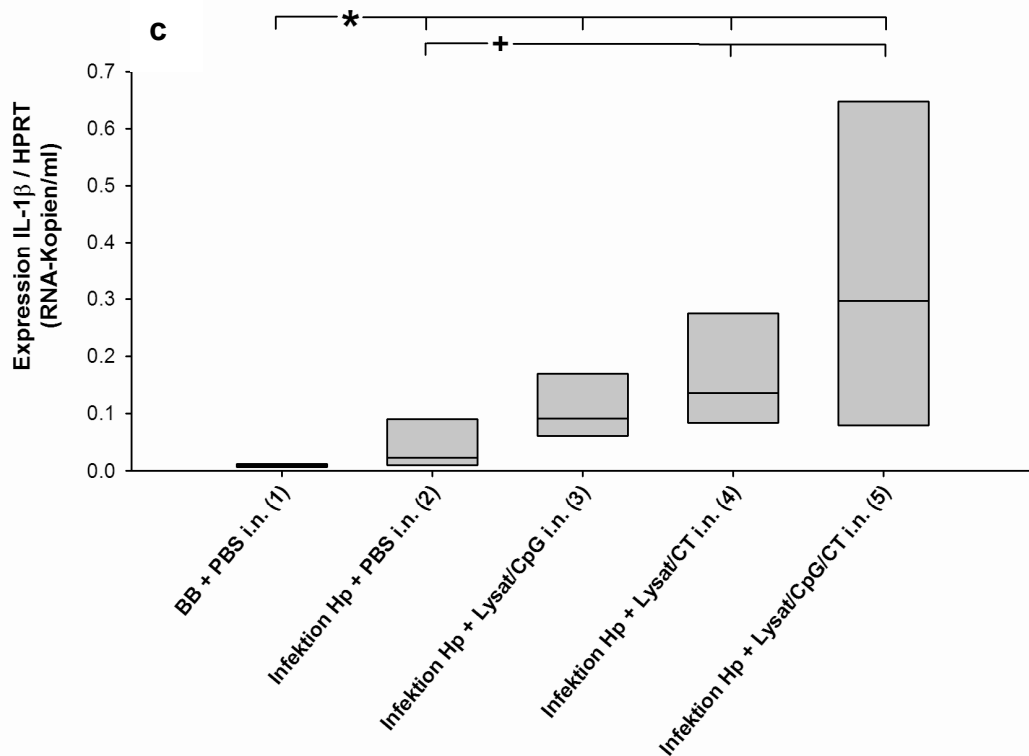
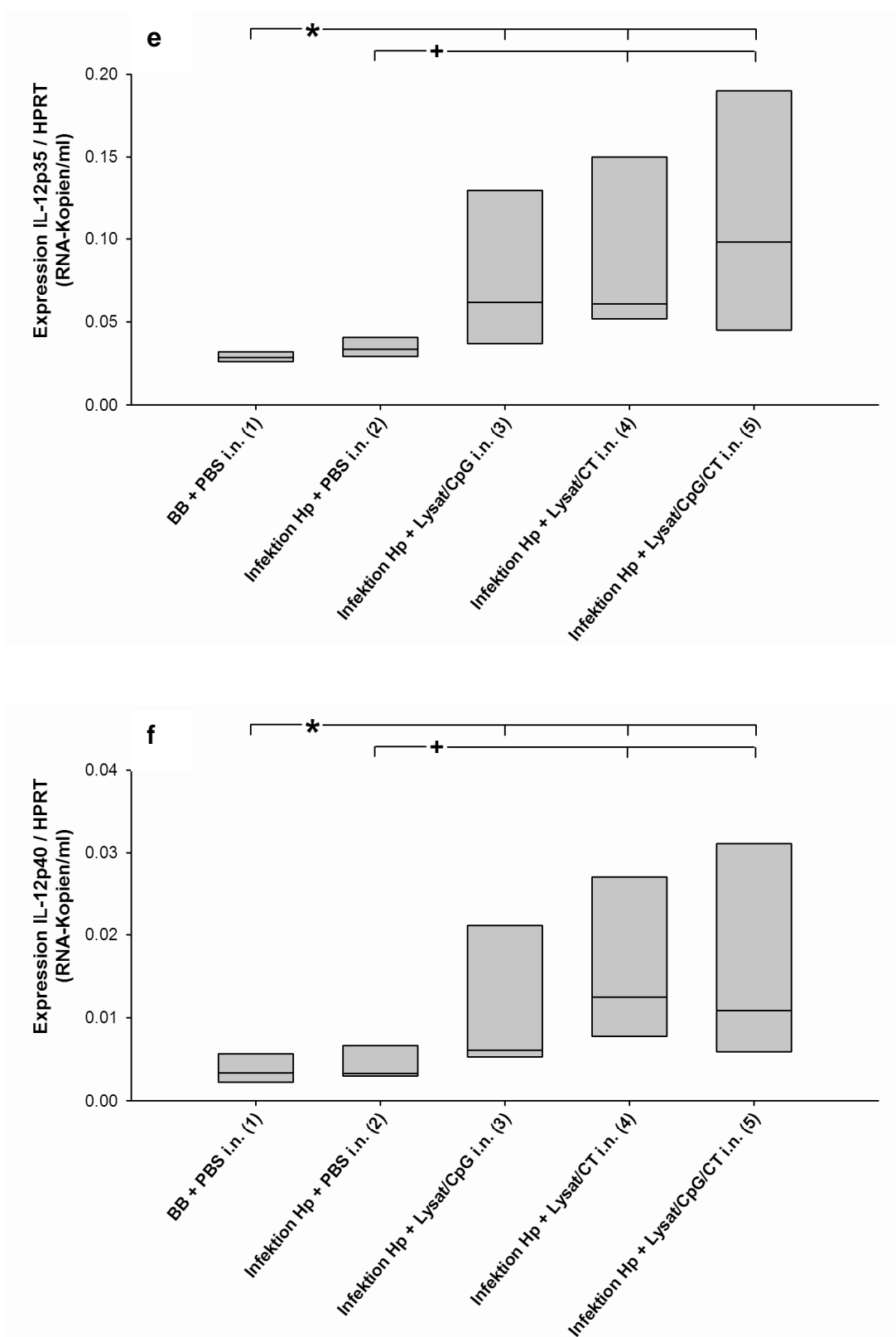


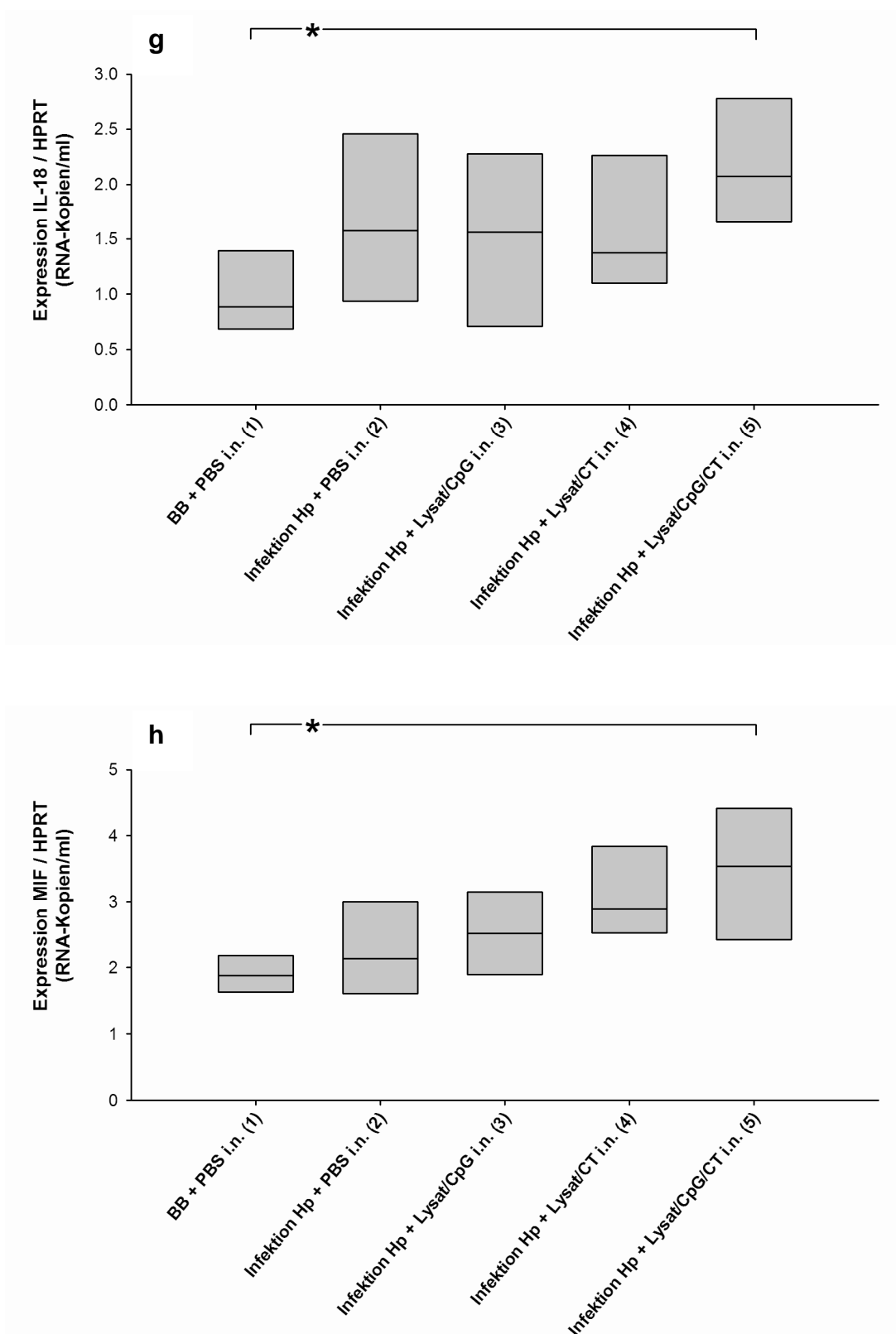
Abbildung 24: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz- Kombinationen auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Magengewebe nach vier Wochen Infektionsdauer



Die Analyse der RNA-Expression im Magengewebe erfolgte mithilfe einer quantitativen TaqMan®-PCR. Zur Normalisierung der Messwerte wurde der Quotient aus der RNA-Expression des entsprechenden Ziel-Gens und dem konstitutiv exprimierten Gen HPRT (Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase) gebildet.



24 a) Die Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat (3, 4, 5) führte im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) zu einer statistisch signifikant erhöhten RNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$ . Bei einer Infektion mit dem Bakterium ohne Immunisierung (2) wurde nach vier



Wochen Infektionsdauer gegenüber der Kontrollgruppe (1) keine gesteigerte Expression von IFN- $\gamma$ -RNA beobachtet.

24 b) Gegenüber der nicht-infizierten Kontrolle (1) konnte die RNA-Expression von IL-6 in infizierten Tieren nur durch die Immunisierung mit Cholera-Toxin (4, 5) signifikant erhöht werden.



24 c) Die Expression von IL-1 $\beta$ -RNA wurde im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren (1) durch eine Infektion mit *H. pylori* (2, 3, 4, 5) signifikant gesteigert, eine Immunisierung mit Cholera-Toxin (4, 5) führte jedoch im Vergleich zu nur mit *H. pylori* infizierten Gerbils (2) zu einer nochmals erhöhten Expression des proinflammatorischen Zytokins.

24 d) Eine verstärkte Expression von TNF-RNA konnte gegenüber der nicht-infizierten Kontrolle (1) nur in mit Cholera-Toxin behandelten Tieren (4, 5) festgestellt werden.

24 e) + f) Die Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat (3, 4, 5) führte im Vergleich zu nicht-infizierten Gerbils (1) zu einer verstärkten RNA-Expression der beiden Untereinheiten IL-12p35 und IL-12p40, die durch die Verabreichung von Cholera-Toxin (4, 5) gegenüber der Infektionskontrollgruppe (2) noch gesteigert werden konnte.

24 g) + h) Nur durch eine kombinierte Immunisierung aus Lysat, CpG-ODN und Cholera-Toxin (5) konnte nach vier Wochen Infektionsdauer eine erhöhte Expression von IL-18- und MIF-RNA beobachtet werden.

\* = nicht-infiziert (1) vs. infiziert (2, 3, 4, 5); + = infiziert/nicht-immunisiert (2) vs. infiziert/immunisiert (3, 4, 5);  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=6$

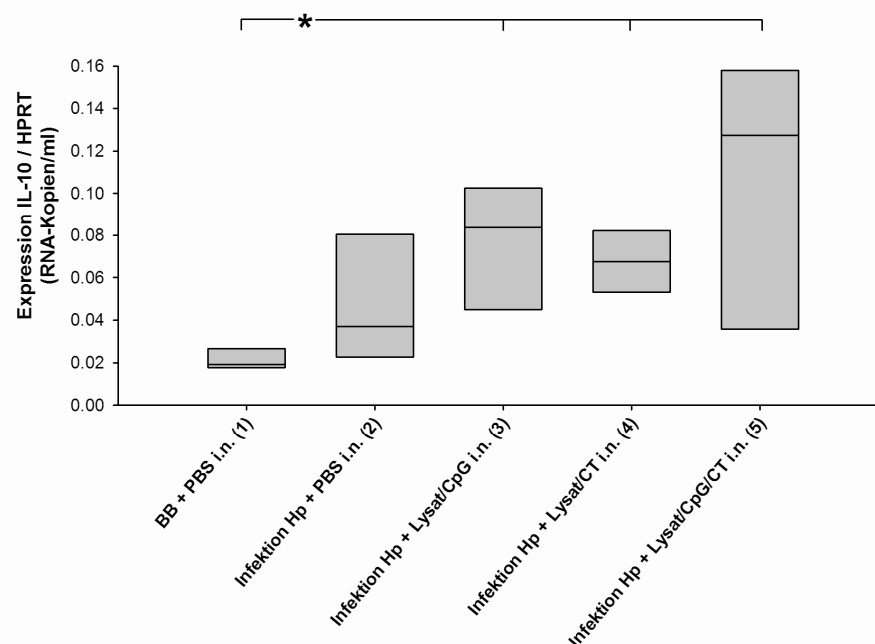
Die erhöhte RNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  konnte, wie in Abbildung 24 a) gezeigt, im Gegensatz zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) statistisch signifikant in allen mit *H. pylori*-Lysat immunisierten Gerbils beobachtet werden (3, 4, 5). Die Verwendung unterschiedlicher Adjuvanzen spielte dabei keine Rolle. Eine Infektion mit dem Bakterium ohne Immunisierung (2) führte nach vier Wochen Infektionsdauer gegenüber der Kontrollgruppe (1) zu keiner gesteigerten Expression von IFN- $\gamma$ -RNA im Magengewebe. Wie in Abbildung 24 b) gezeigt, konnte IL-6-RNA bei *H. pylori*-infizierten Tieren statistisch signifikant im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) nur in den Gruppen nachgewiesen werden, die zuvor eine Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat und CT als Adjuvanz erhielten (4, 5). Diese durch Cholera-Toxin hervorgerufene Steigerung zeigte sich bei der Analyse der Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF, IL-12p35 und IL-12p40 noch sehr viel ausgeprägter. Es konnte nur bei Immunisierung mit dem Adjuvanz CT eine im Vergleich zur Infektionskontrolle (2) signifikant verstärkte RNA-Expression im Magengewebe beobachtet werden. Wie in den Abbildungen 24 c) und 24 d) gezeigt, führte bereits eine Infektion mit *H. pylori* (2) zu einer im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) erhöhten Expression der beiden proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF, die durch die Verabreichung von CT als Adjuvanz (4, 5) nochmals gesteigert werden konnte. Auf die Expression des frühen, Th1-induzierenden Zytokins IL-12 (p35 und p40) hatte die Infektion mit



*H. pylori* keinen Einfluss, sondern nur die Immunisierung mit Lysat. Hier konnte wie in den Abbildungen 24 e) und 24 f) gezeigt durch eine Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat (3, 4, 5) eine im Vergleich zu nicht-infizierten Gerbils (1) statistisch signifikant erhöhte Expression von IL-12p35 und IL-12p40 nachgewiesen werden, die durch die Immunisierung mit CT als Adjuvanz (4, 5) stark gesteigert wurde. Wie den Abbildungen 24 g) und 24 f) dargestellt konnte für IL-18 und auch MIF gegenüber der nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) eine signifikant erhöhte RNA-Expression nur bei den Tieren beobachtet werden, die eine kombinierte Immunisierung aus Lysat, CpG-ODN und Cholera-Toxin (5) erhalten hatten.

#### 5.2.7.1.2 Antiinflammatorische Zytokine

Zum Zeitpunkt vier Wochen nach Infektion der Gerbils mit *H. pylori* konnte im Vergleich zu den Kontrollgruppen in keiner der behandelten und infizierten Gruppen (3, 4, 5) eine signifikant gesteigerte RNA-Expression von IL-4 nachgewiesen werden (siehe Tabelle 9).



**Abbildung 25: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von IL-10 im Magengewebe nach vier Wochen Infektionsdauer**

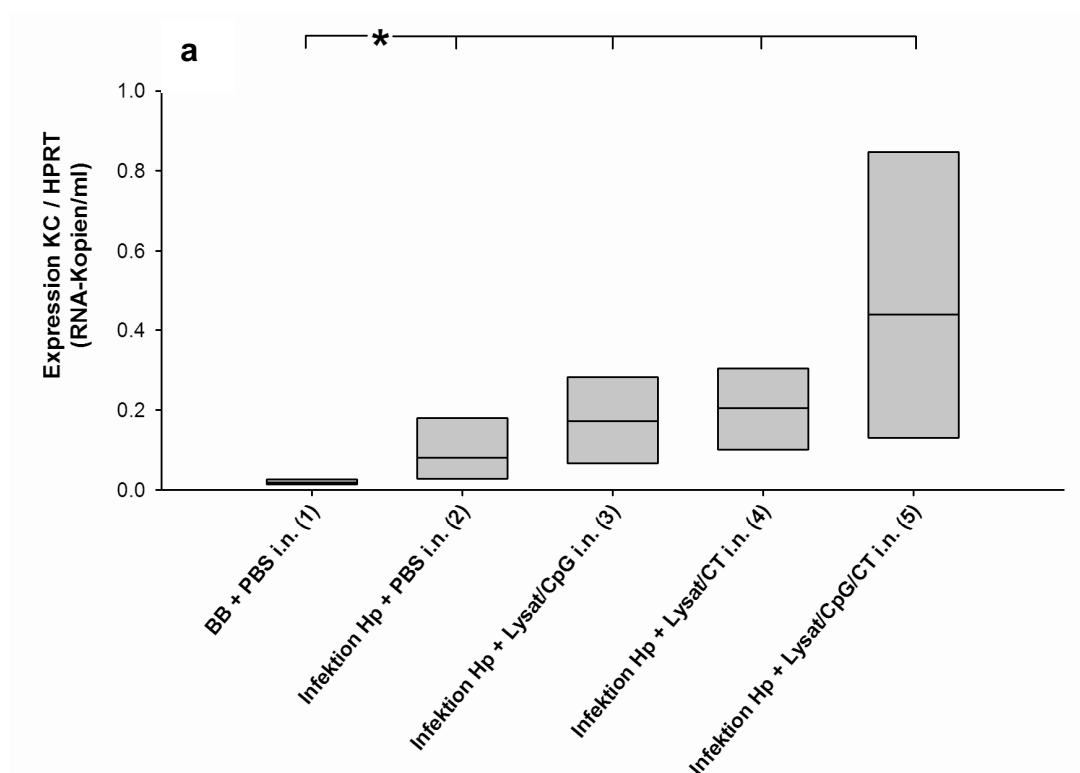
Die Kombination aus Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat und Infektion (3, 4, 5) führte zu einer statistisch signifikant erhöhten RNA-Expression von IL-10 im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1). Bei einer Infektion mit dem Bakterium ohne Immunisierung (2) wurde gegenüber der

Kontrollgruppe (1) nach vier Wochen Infektionsdauer keine gesteigerte Expression des regulatorisch wirksamen Zytokins beobachtet.

\* = nicht-infiziert (1) vs. infiziert (2, 3, 4, 5); + = infiziert/nicht-immunisiert (2) vs. infiziert/immunisiert (3, 4, 5);  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=6$

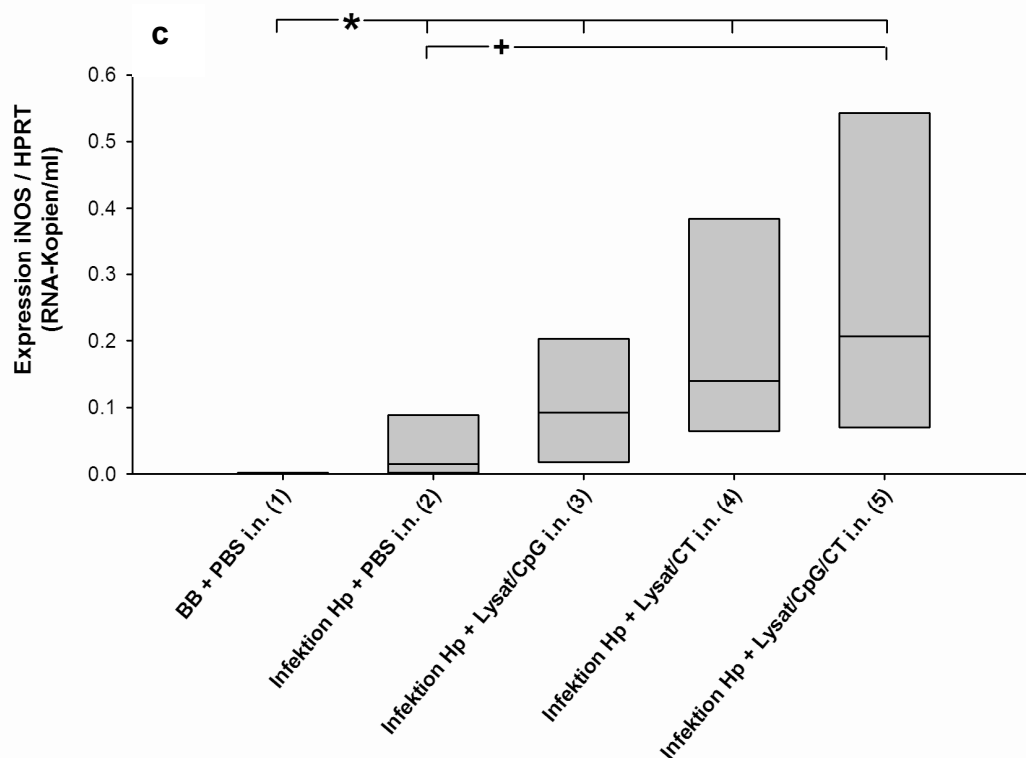
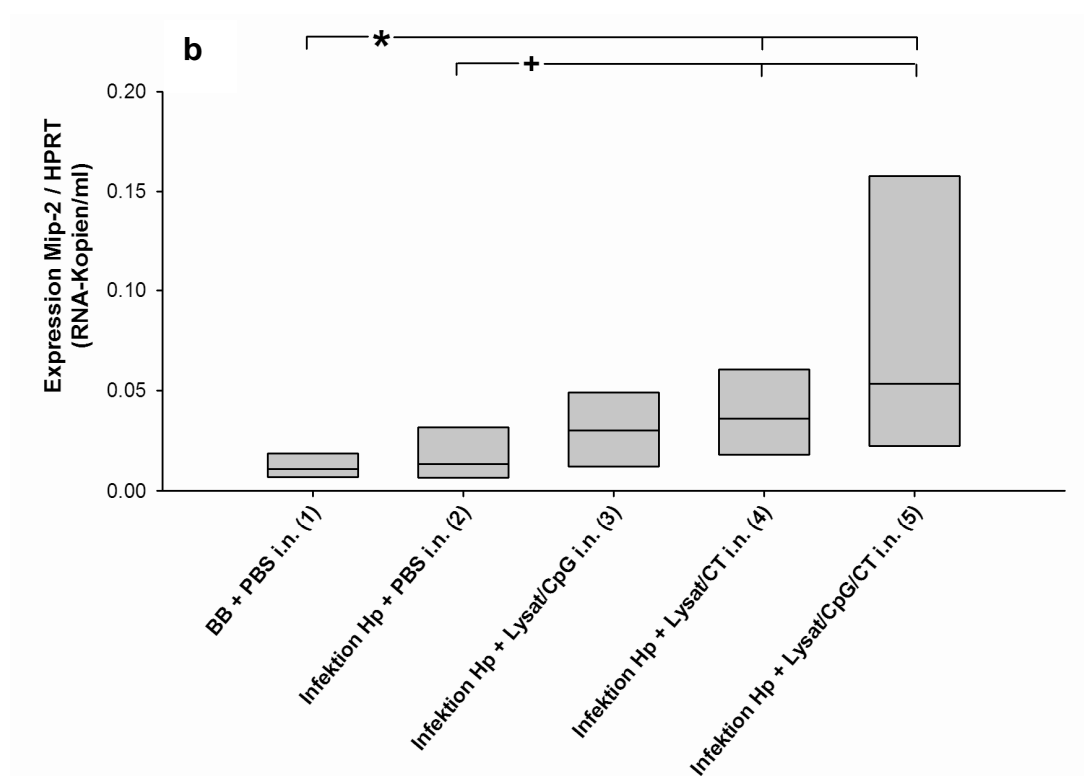
Wie in Abbildung 25 gezeigt, führte die Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat (3, 4, 5) im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) zu einer statistisch signifikant gesteigerten Expression von IL-10-RNA im Magengewebe.

### 5.2.7.1.3 Chemokine und iNOS



**Abbildung 26: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von Chemokinen und iNOS im Magengewebe nach vier Wochen Infektionsdauer**

26 a) Im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1), konnte in allen mit *H. pylori* infizierten Versuchsgruppen (2, 3, 4, 5) eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression des Chemokins KC beobachtet werden.



26 b) Eine verstärkte Expression von Mip-2-RNA wurde nach vier Wochen Infektionsdauer ausschließlich in den mit Cholera-Toxin behandelten Gerbils (4, 5) nachgewiesen. Es zeigte sich in diesen beiden Gruppen eine im Vergleich zu infizierten Tieren (2) signifikant gesteigerte RNA-Expression von Mip-2.

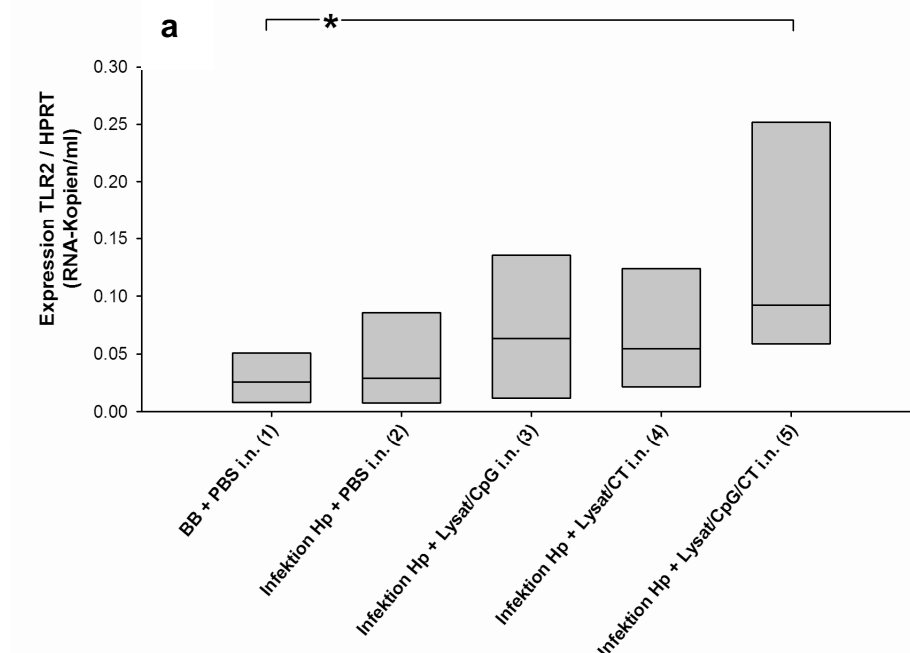
26 c) Die Expression von iNOS-RNA konnte durch eine Infektion mit *H. pylori* (2, 3, 4, 5) im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) signifikant erhöht werden. Die kombinierte Immunisierung mit Lysat und den beiden Adjuvanzen CpG-ODN und CT (5) führte gegenüber nur infizierten Tieren (2) zu einer Verstärkung der RNA-Expression.

\* = nicht-infiziert (1) vs. infiziert (2, 3, 4, 5); + = infiziert/nicht-immunisiert (2) vs. infiziert/immunisiert (3, 4, 5);  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=6$

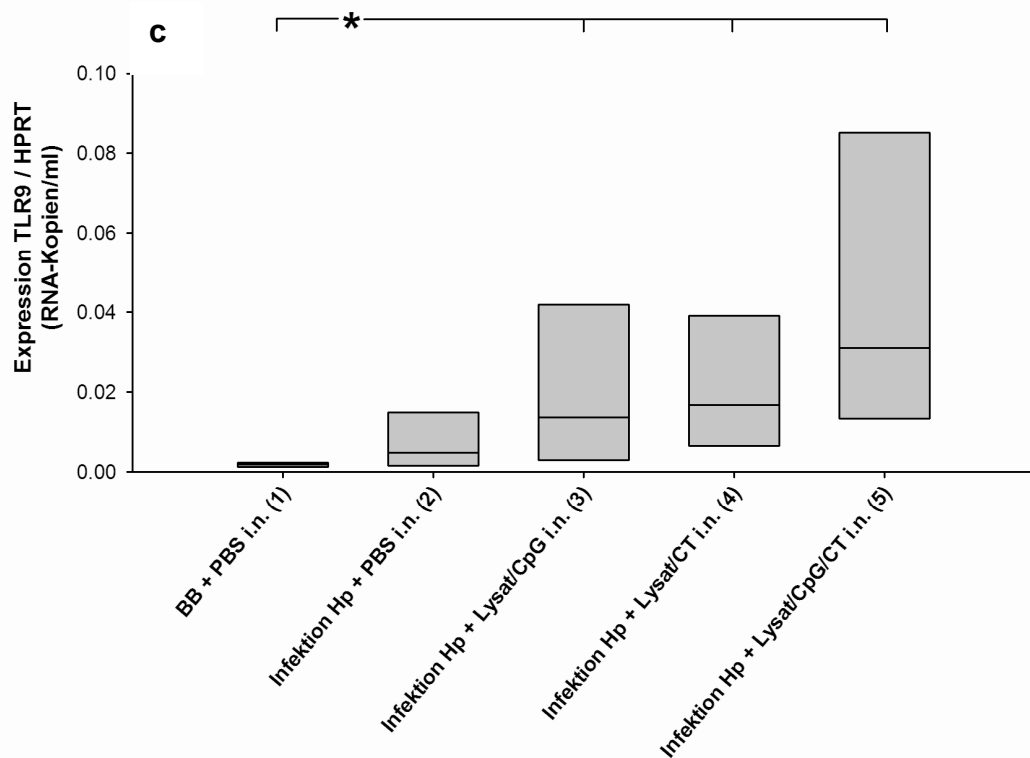
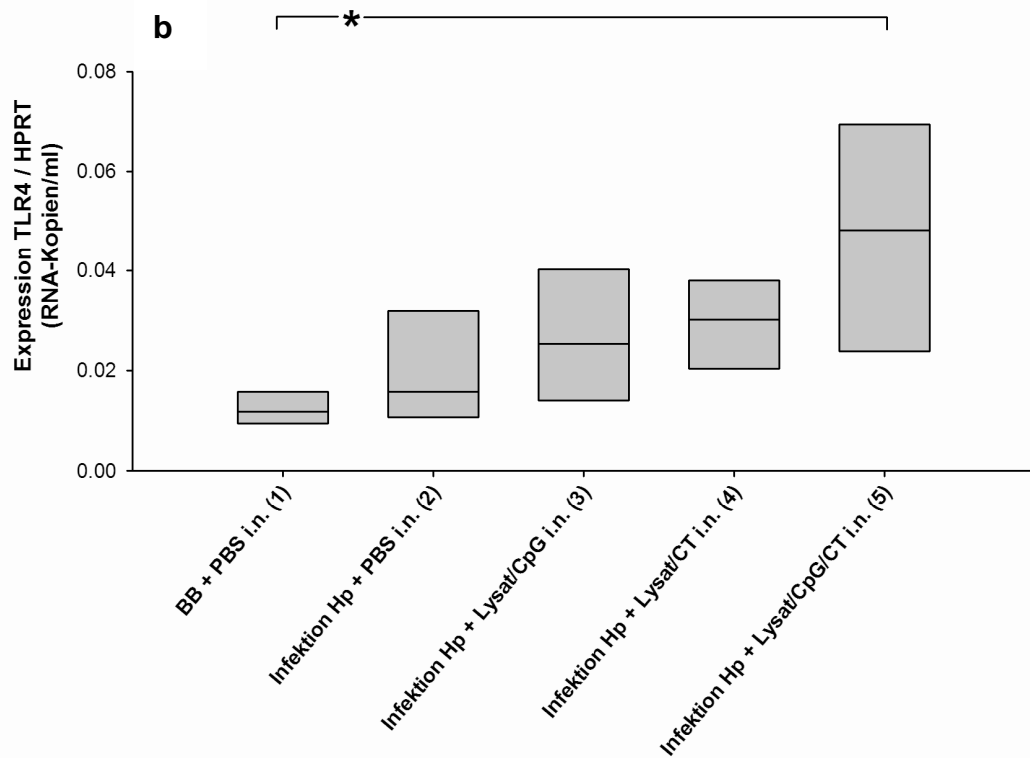
Das Chemokin KC wurde, wie in Abbildung 26 a) dargestellt, im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) von allen mit *H. pylori* infizierten Gerbils (2, 3, 4, 5) signifikant erhöht exprimiert. Wie Abbildung 26 b) zeigt, beschränkte sich die Expression von Mip-2 im Gegensatz dazu auf die mit Cholera-Toxin als Adjuvanz immunisierten Gruppen (4, 5).

Die RNA-Expression des Enzyms iNOS konnte, wie in Abbildung 26 c) gezeigt, im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) signifikant erhöht in allen mit *H. pylori* infizierten Gerbils (2, 3, 4, 5) beobachtet werden, jedoch wurde diese Expression durch die Verabreichung einer kombinierten Immunisierung mit Lysat/CpG/CT (5) gegenüber der Infektionskontrolle (2) nochmals gesteigert.

#### 5.2.7.1.4 Toll-like Rezeptoren



**Abbildung 27:** Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von Toll-like Rezeptoren im Magengewebe nach vier Wochen Infektionsdauer



27 a) Nur eine kombinierte Immunisierung mit Lysat/CpG/CT (5) führte zu einer statistisch signifikant gesteigerten Expression von TLR2-RNA im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1).  
 27 b) Wie bei TLR2 wurde auch die RNA von TLR4 gegenüber der nicht-infizierten Kontrolle (1) nur bei einer kombiniert verabreichten Immunisierung (5) verstärkt exprimiert.

27 c) Die RNA-Expression von TLR9 wurde durch die Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat (3, 4, 5) im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) signifikant gesteigert.

\* = nicht-infiziert (1) vs. infiziert (2, 3, 4, 5); + = infiziert/nicht-immunisiert (2) vs. infiziert/immunisiert (3, 4, 5);  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=6$

Die RNA-Expression von TLR2 und TLR4 konnte, wie in Abbildung 27 a) und 27 b) gezeigt, im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) nur durch die kombinierte Immunisierung aus Lysat/CpG/CT (5) statistisch signifikant verstärkt werden. In dieser Arbeit zeigte sich zum Zeitpunkt vier Wochen nach Infektion der Gerbils mit *H. pylori* im Vergleich zu den Kontrollgruppen in keiner der behandelten und infizierten Gruppen eine erhöhte Expression von TLR5-RNA (siehe Tabelle 9). Wie in Abbildung 27 c) dargestellt, führte eine Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat (3, 4, 5) zu einer gegenüber der nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) signifikant gesteigerten RNA-Expression von TLR9.

### 5.2.7.1.5 Übersicht und Zusammenfassung: RNA-Expressionsprofil des Magens nach vier Wochen Infektionsdauer

	BB + PBS i.n. (1)	Infektion Hp + PBS i.n. (2)	Infektion Hp + Lysat/CpG i.n. (3)	Infektion Hp + Lysat/CT i.n. (4)	Infektion Hp + Lysat/CpG/CT i.n. (5)
<b>Proinflammatorische Zytokine</b>					
IFN- $\gamma$	-	-	*	*	*
IL-6	-	-	-	*	*
IL-1 $\beta$	-	*	*	+	+
TNF	-	*	*	+	+
IL-12p35	-	-	*	+	+
IL-12p40	-	-	*	+	+
IL-18	-	-	-	-	*
MIF	-	-	-	-	*
<b>Antiinflammatorische Zytokine</b>					
IL-4	-	-	-	-	-
IL-10	-	-	*	*	*
<b>Chemokine und iNOS</b>					
KC	-	*	*	*	*
Mip-2	-	-	-	+	+
iNOS	-	*	*	*	+
<b>Toll-like Rezeptoren</b>					
TLR2	-	-	-	-	*
TLR4	-	-	-	-	*
TLR5	-	-	-	-	-
TLR9	-	-	*	*	*

**Tabelle 9: Übersicht RNA-Expressionsprofil des Magens nach vier Wochen Infektionsdauer**

Übersicht über die RNA-Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, iNOS und TLRs im Magengewebe.

- = Expression nicht signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1)

\* = Expression signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1)

+ = Expression signifikant erhöht im Vergleich zur Infektionskontrolle (2)

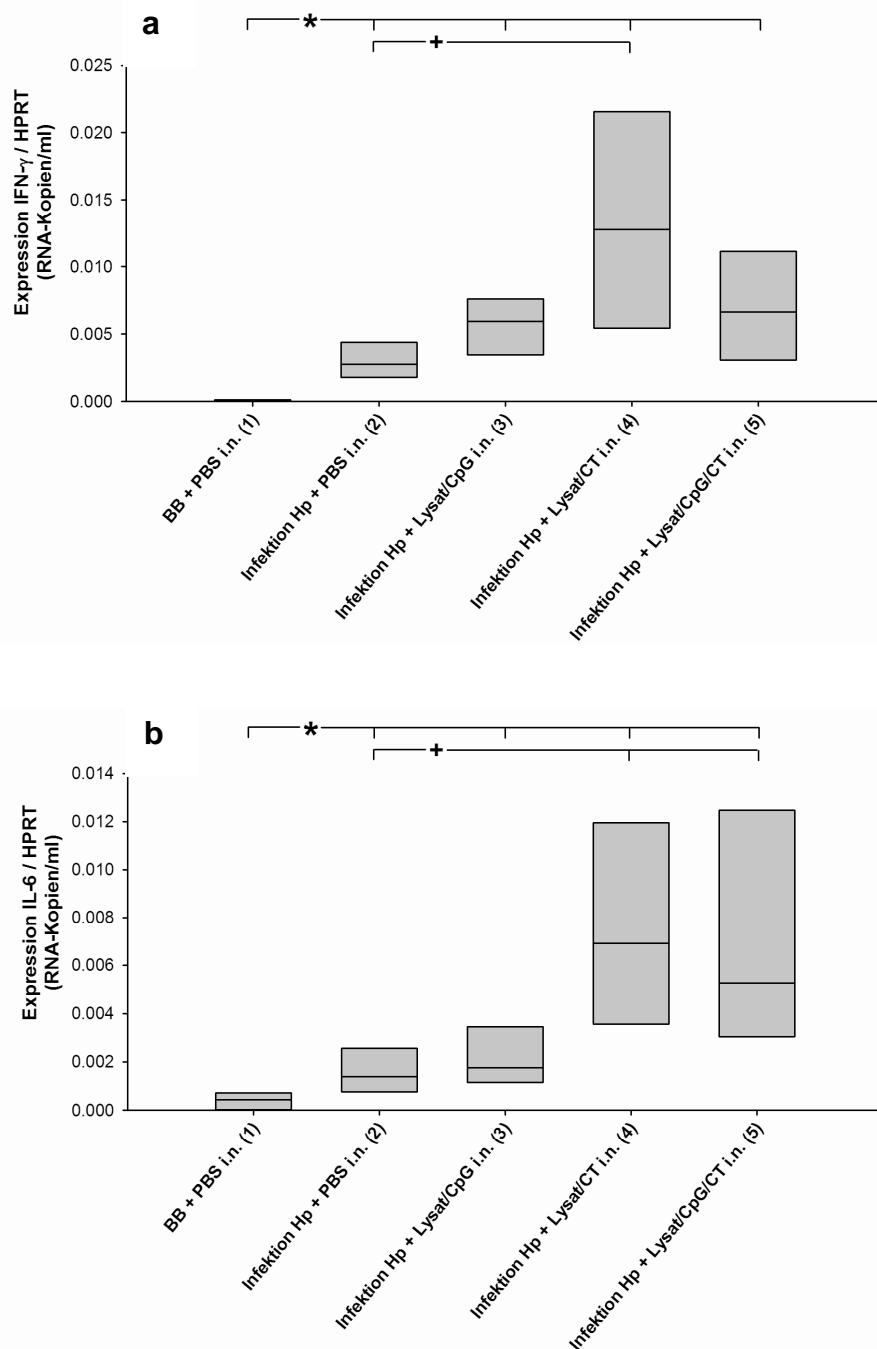
Wie in Tabelle 9 gezeigt, konnte durch eine Infektion mit *H. pylori* nach vier Wochen Infektionsdauer die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF im Magen signifikant gesteigert werden. Die erhöhte RNA-Expression von IFN- $\gamma$  und IL-12 (p35 und p40) war nur auf die Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat zurückzuführen. Besonders wirkungsvoll zeigte sich der Einsatz von Cholera-Toxin als Adjuvanz, das zu einem starken Anstieg der RNA-Expression von IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF und IL-12 führte. Das Leitzytokin der Th2-Immunantwort, IL-4, wurde nicht nachgewiesen, allerdings konnte durch die Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat die RNA-Expression des regulatorisch wirksamen IL-10 induziert werden. Die beiden Chemokine KC und Mip-2, murine Homologe für IL-8, zeigten eine verstärkte Expression, wobei KC in allen infizierten Tieren und Mip-2 nur nach Immunisierung mit Cholera-Toxin nachgewiesen werden konnte. Die gesteigerte RNA-Expression von iNOS lies auf erhöhten nitrosativen Stress in allen infizierten Gerbils schließen. Während TLR2- und TLR4-RNA vor allem in den Tieren exprimiert wurde, die eine kombinierte Immunisierung mit Lysat/CpG/CT erhielten, konnte die Expression von TLR9-RNA in allen mit *H. pylori*-Lysat immunisierten Gerbils beobachtet werden. Für TLR5 wurde vier Wochen nach der Infektion gegenüber den Kontrollgruppen keine veränderte Expression beobachtet.

Eine Infektion mit *H. pylori* führte in diesem experimentellen Ansatz nach vier Wochen Infektionsdauer im Vergleich zu nicht-infizierten Gerbils zu nur wenigen verstärkt exprimierten immunologischen Parametern. Größeren Einfluss hatte die Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat, durch welche eine bisher nicht beobachtete Expression von IL-10-RNA nachgewiesen werden konnte. Die Verwendung von CpG-ODN als Adjuvanz zeigte bei intranasaler Verabreichung keine steigernde Wirkung, während Cholera-Toxin zu einem starken Anstieg der RNA-Expression von überwiegend proinflammatorischen Zytokinen führte.

#### **5.2.7.2 RNA-Expressionsprofil nach acht Wochen Infektionsdauer**

##### **5.2.7.2.1 Proinflammatorische Zytokine**

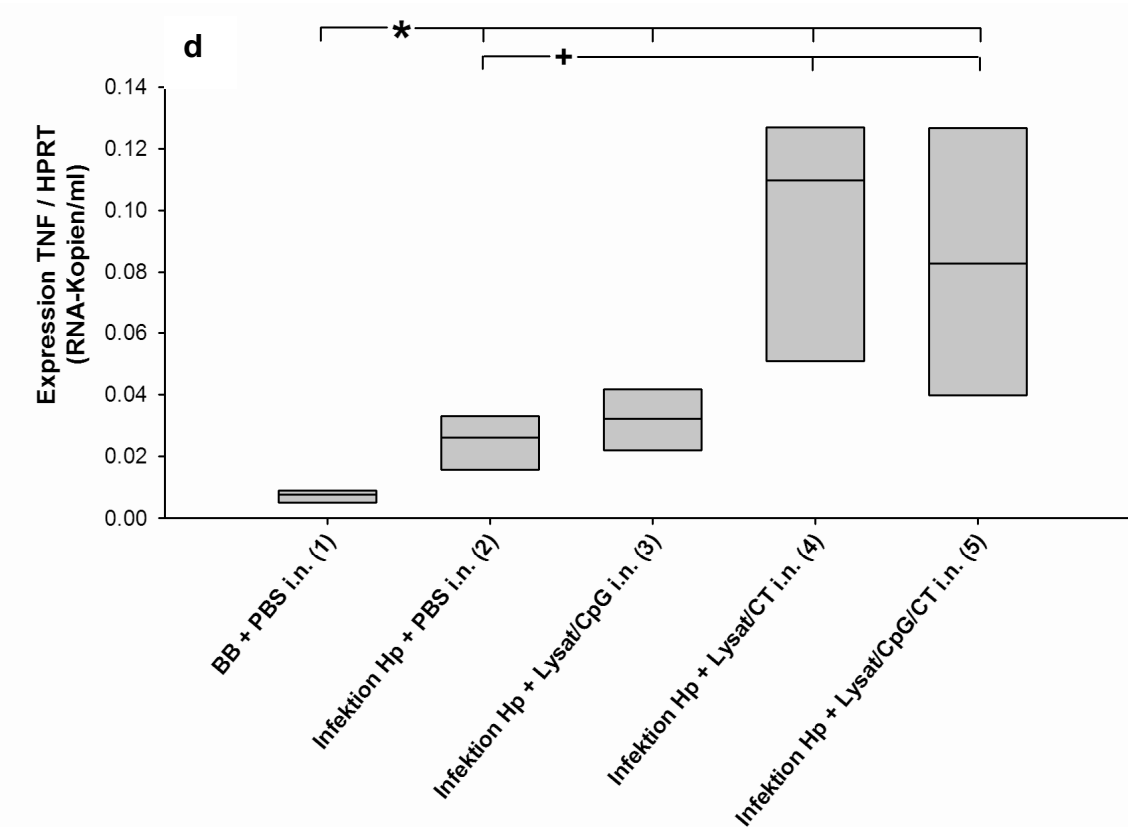
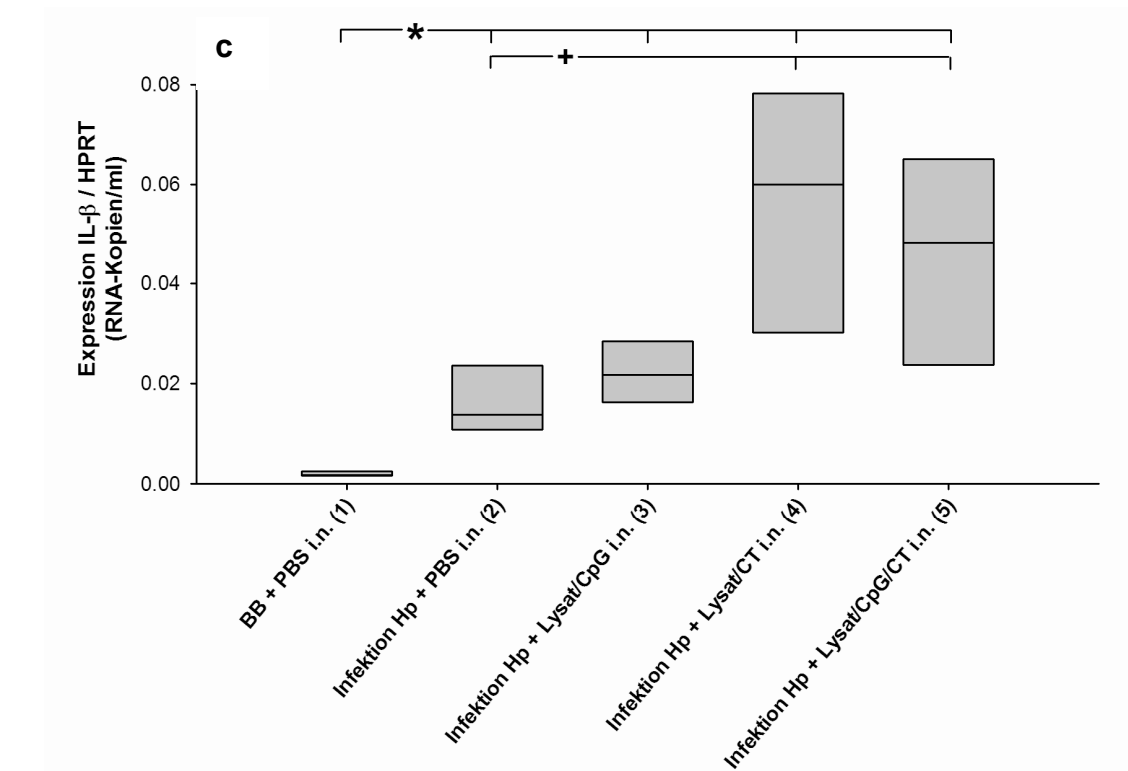


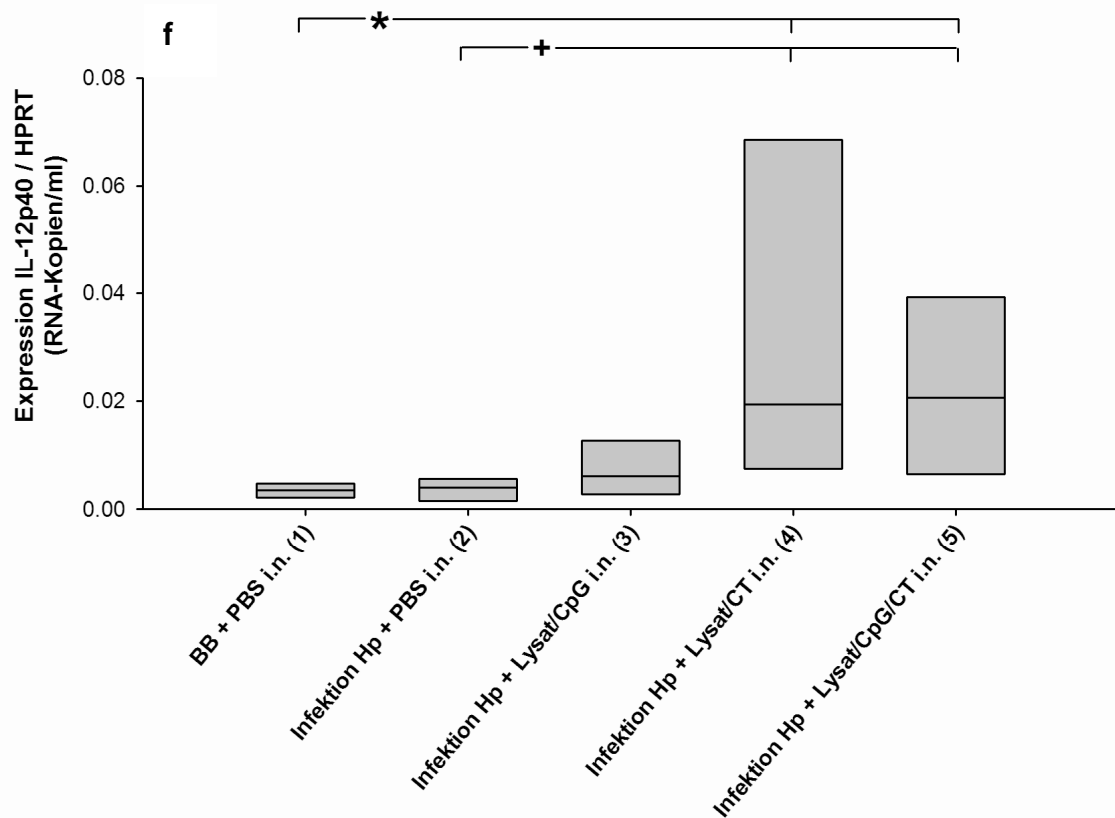
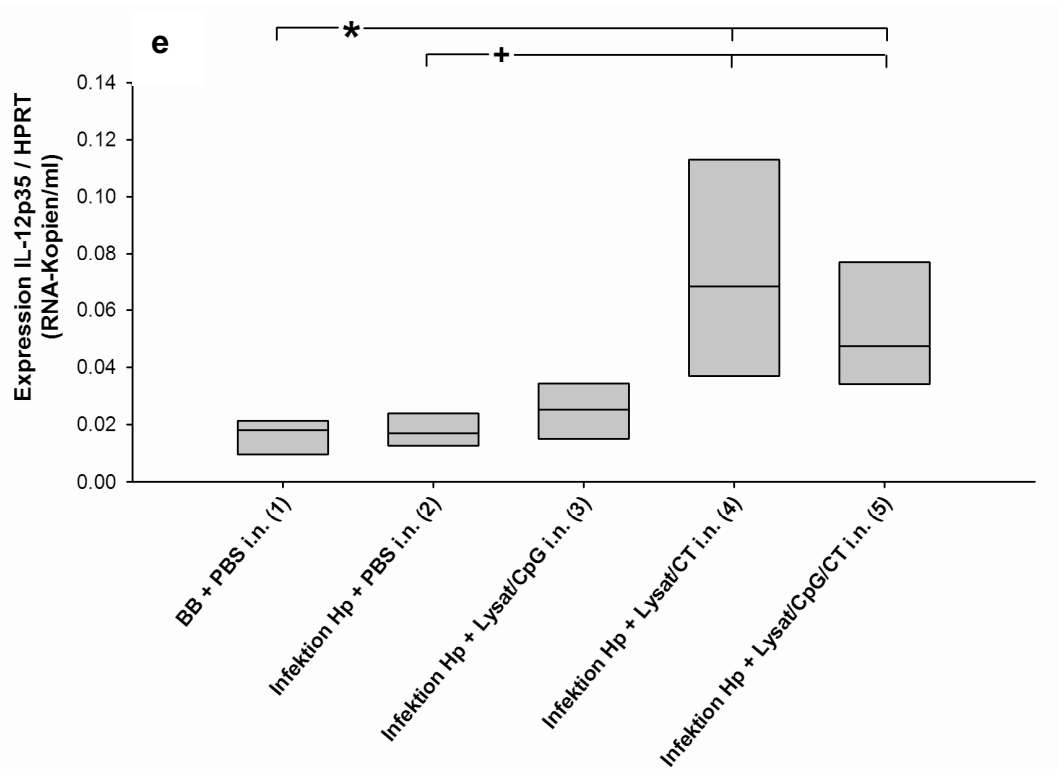


**Abbildung 28: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Magengewebe nach acht Wochen Infektionsdauer**

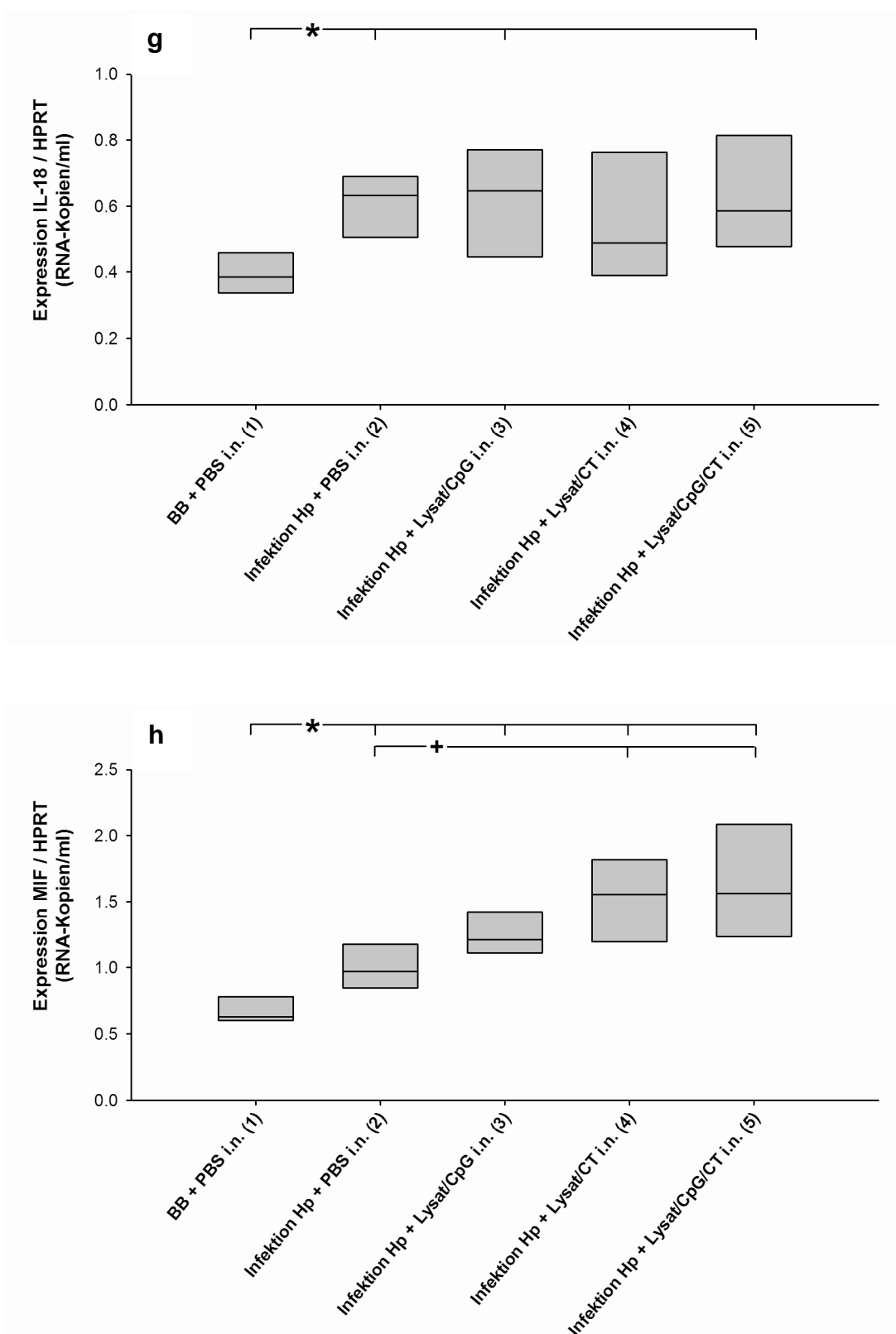
28 a) Durch eine Infektion mit *H. pylori* (2, 3, 4, 5) konnte im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) nach acht Wochen Infektionsdauer eine signifikant erhöhte RNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  beobachtet werden.

28 b) + c) + d) + h) Die Expression von IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF und MIF wurde durch eine Infektion mit *H. pylori* (2, 3, 4, 5) gegenüber nicht-infizierten Gerbils (1) statistisch signifikant gesteigert, der Einsatz von Cholera-Toxin als Adjuvanz (4, 5) führte zu einem starken Anstieg der RNA-Expression im Vergleich zur Infektionskontrolle (2).





28 e) + f) Eine statistisch erhöhte Expression von IL-12p35- und p40-RNA konnte gegenüber den Kontrollgruppen (1, 2) nur beim Einsatz von Cholera-Toxin als Adjuvanz (4, 5) beobachtet werden.



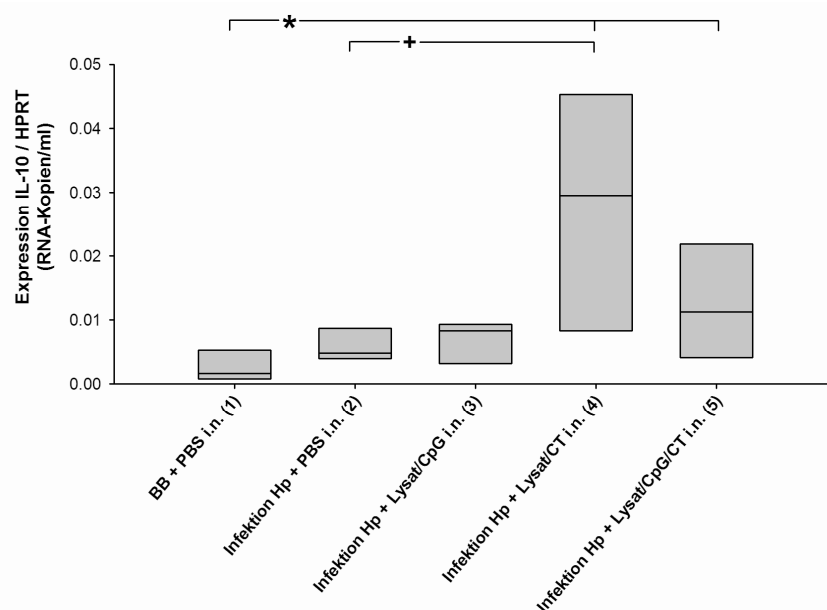
28 g) Durch eine Infektion mit *H. pylori* (2, 3, 5) wurde das proinflammatorische Zytokin IL-18 im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) verstärkt exprimiert.

\* = nicht-infiziert (1) vs. infiziert (2, 3, 4, 5); + = infiziert/nicht-immunisiert (2) vs. infiziert/immunisiert (3, 4, 5);  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=6$

Die signifikant erhöhte RNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  konnte, wie in Abbildung 28 a) dargestellt, im Gegensatz zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) in allen mit *H. pylori* infizierten Gerbils beobachtet werden (3, 4, 5). Wie in den Abbildungen 28 b), c), d) und h) gezeigt, wurde die Expression von IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF und MIF durch eine Infektion mit *H. pylori* (2, 3, 4, 5) gegenüber nicht-infizierten Tieren (1) statistisch signifikant gesteigert. Die Verabreichung von Cholera-Toxin als Adjuvanz (4, 5) führte im Vergleich zur Infektionskontrolle (2) zu einem starken Anstieg der RNA-Expression. In den Abbildungen 28 e) und 26 f) ist dargestellt, wie es nur durch den Einsatz von Cholera-Toxin als Adjuvanz (4, 5) gegenüber den Kontrollgruppen (1, 2) zu einer Expression von IL-12p35- und p40 kam. Die RNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-18 konnte, wie in 28 g) gezeigt, im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) durch eine Infektion mit *H. pylori* (2, 3, 5) verstärkt beobachtet werden.

#### 5.2.7.2.2 Antiinflammatorische Zytokine

Zum Zeitpunkt acht Wochen nach Infektion der Gerbils mit *H. pylori* konnte im Vergleich zu den Kontrollgruppen in keiner der Versuchsgruppen eine signifikant veränderte RNA-Expression von IL-4 nachgewiesen werden (siehe Tabelle 10).



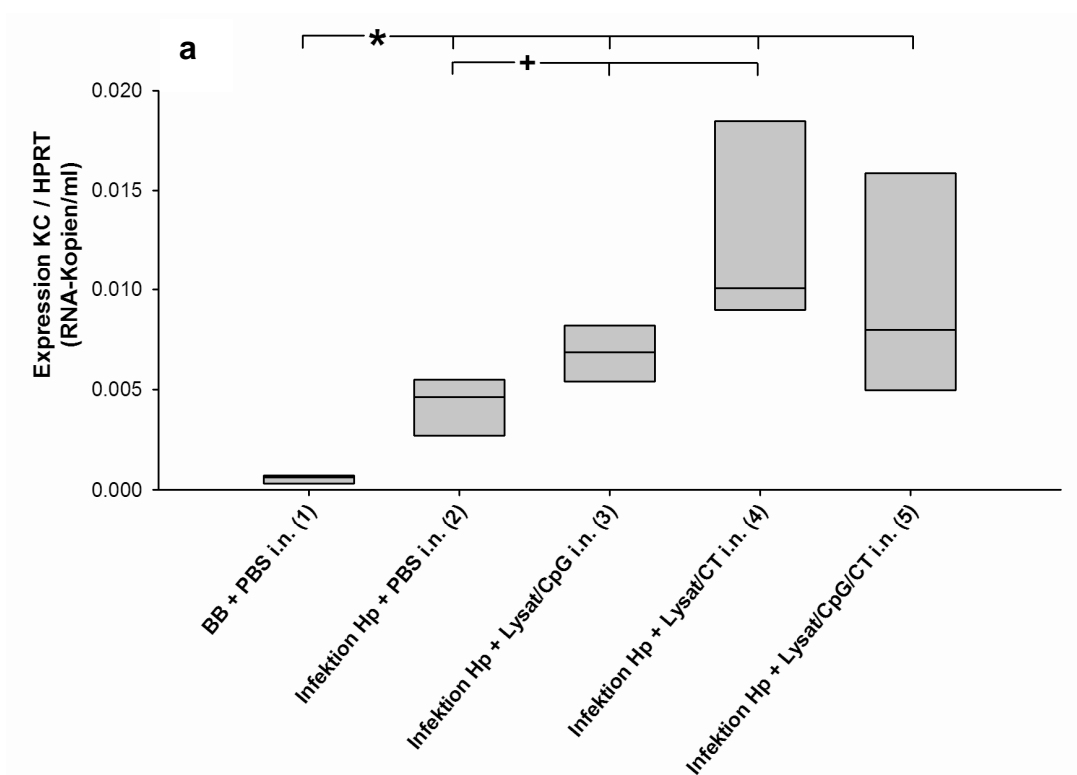
**Abbildung 29:** Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von IL-10 im Magengewebe nach acht Wochen Infektionsdauer

Die Expression von IL-10-RNA konnte nach acht Wochen Infektionsdauer gegenüber der Kontrollgruppe (1) nur durch eine Immunisierung mit Cholera-Toxin als Adjuvanz (4, 5) nachgewiesen werden.

\* = nicht-infiziert (1) vs. infiziert (2, 3, 4, 5); + = infiziert/nicht-immunisiert (2) vs. infiziert/immunisiert (3, 4, 5);  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=6$

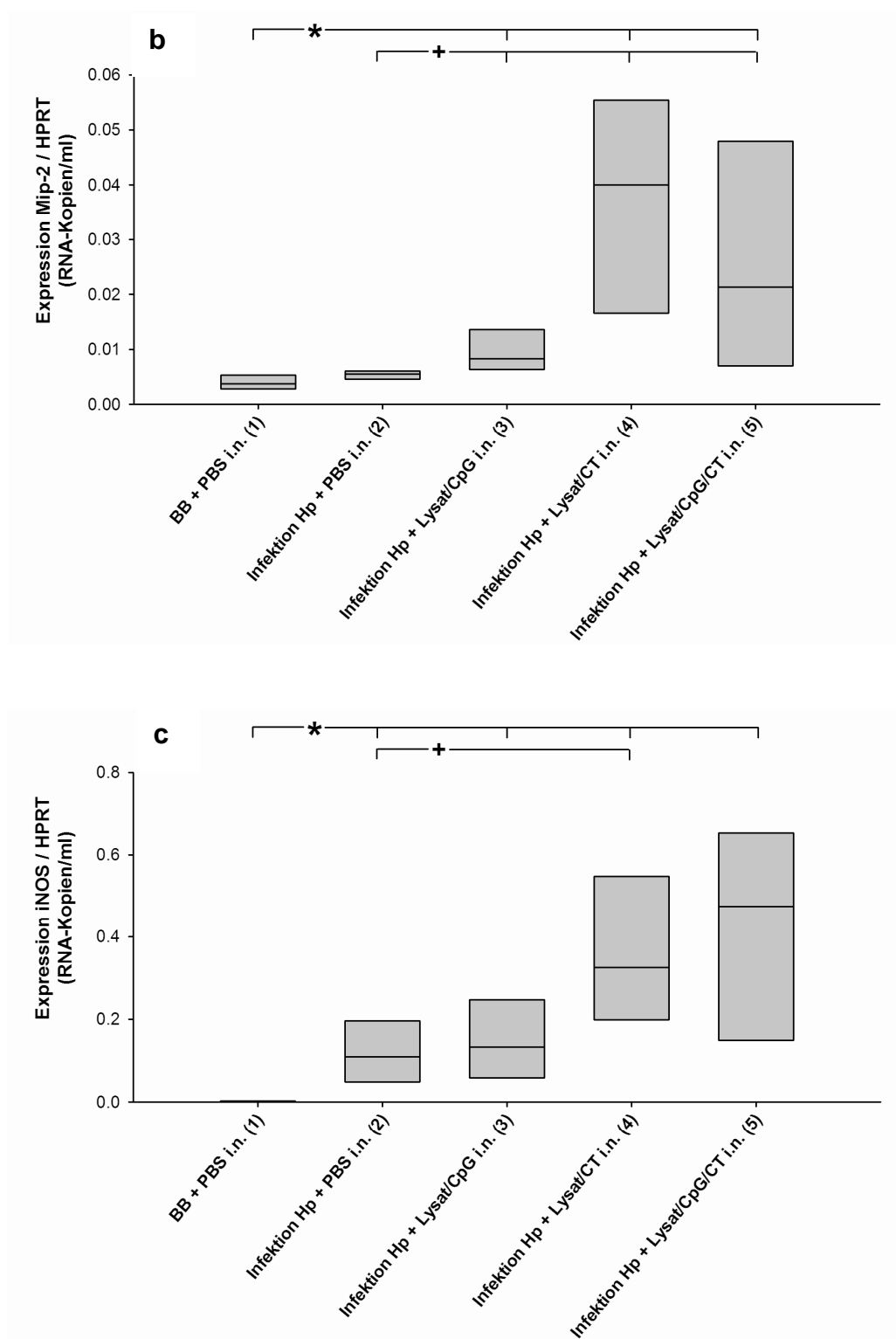
Wie in Abbildung 29 gezeigt, führte eine Immunisierung mit Cholera-Toxin als Adjuvanz (4, 5) im Vergleich zur Kontrollgruppe (1) zu einer verstärkten Expression von IL-10-RNA im Magengewebe.

### 5.2.7.2.3 Chemokine und iNOS



**Abbildung 30: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von Chemokinen und iNOS im Magengewebe nach acht Wochen Infektionsdauer**

30 a) Eine Infektion mit *H. pylori* (2, 3, 4, 5) führte nach acht Wochen Infektionsdauer im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) zu einer erhöhten RNA-Expression von KC, die durch die Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat (3, 4) gegenüber der Infektionskontrolle (2) gesteigert werden konnte.



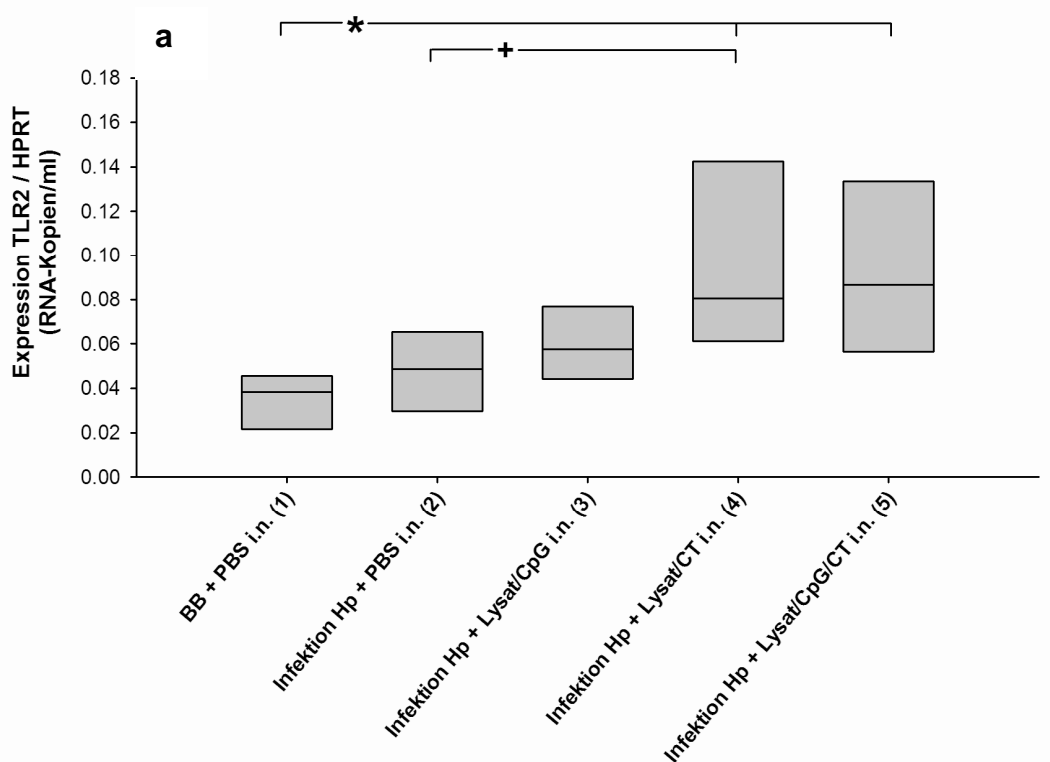
30 b) Durch eine Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat (3, 4, 5) wurde die Expression von Mip-2-RNA im Vergleich zu infizierten Gerbils (2) signifikant erhöht.

30 c) Die RNA-Expression von iNOS konnte gegenüber der nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) in allen infizierten Tieren (2, 3, 4, 5) nachgewiesen werden.

\* = nicht-infiziert (1) vs. infiziert (2, 3, 4, 5); + = infiziert/nicht-immunisiert (2) vs. infiziert/immunisiert (3, 4, 5);  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=6$

Das Chemokin KC wurde, wie in Abbildung 30 a) dargestellt, im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) von allen mit *H. pylori* infizierten Tieren (2, 3, 4, 5) signifikant erhöht exprimiert. Wie Abbildung 30 b) zeigt, beschränkte sich die im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle verstärkte Expression von Mip-2 auf die Tiere, die mit *H. pylori*-Lysat (3, 4, 5) immunisiert wurden. Bei allen infizierten Tieren (2, 3, 4, 5) konnte wie in Abbildung 30 c) dargestellt eine gegenüber der nicht-infizierten Kontrolle signifikant erhöhte RNA-Expression von iNOS nachgewiesen werden.

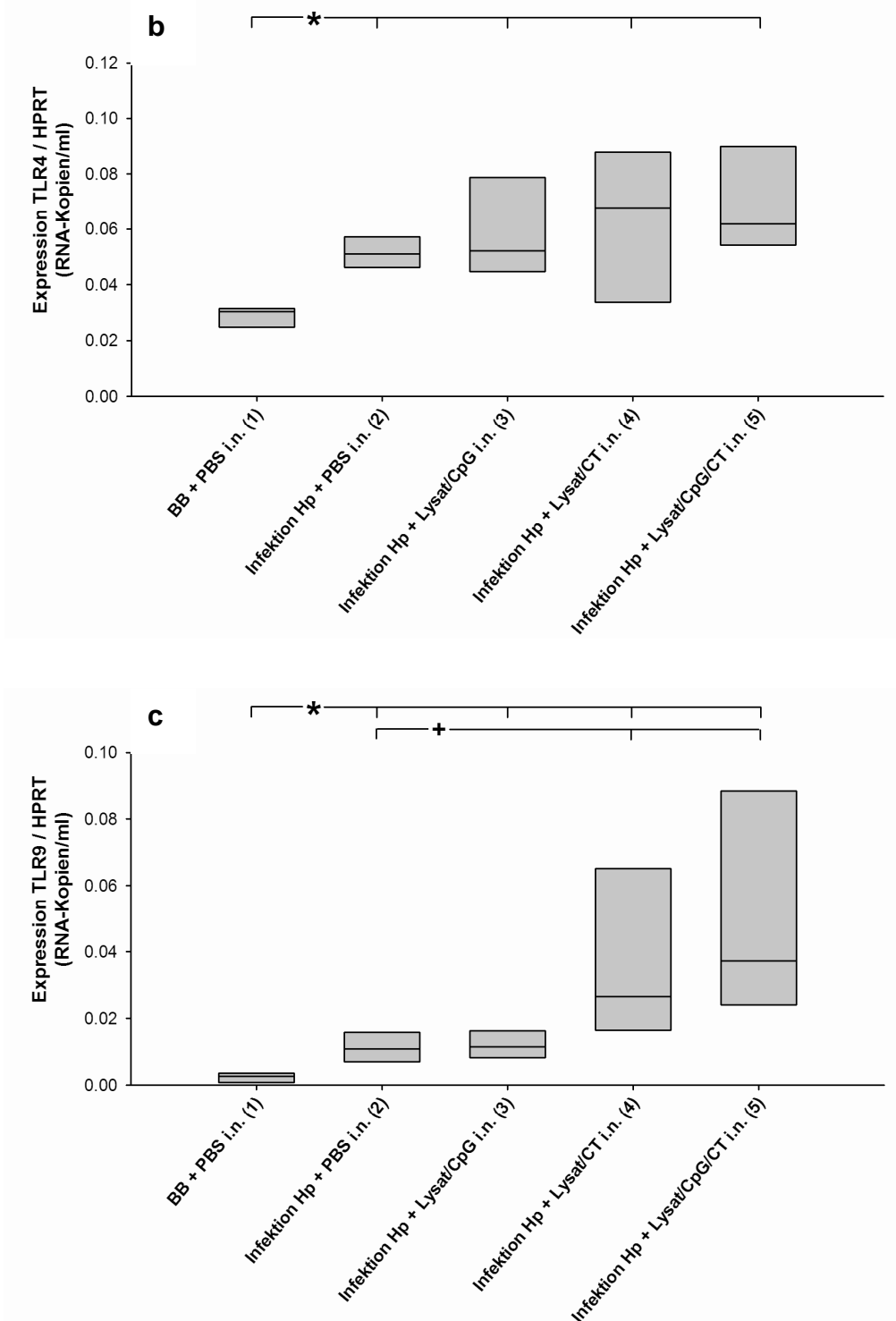
#### 5.2.7.2.4 Toll-like Rezeptoren



**Abbildung 31: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz- Kombinationen auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von Toll-like Rezeptoren im Magengewebe nach acht Wochen Infektionsdauer**

31 a) Die gegenüber der Kontrollgruppe (1) gesteigerte Expression von TLR2-RNA konnte nur durch eine Immunisierung mit Cholera-Toxin als Adjuvanz (4, 5) beobachtet werden.





31 b) Eine Infektion mit *H. pylori* (2, 3, 4, 5) führte gegenüber der nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) zu einer signifikant gesteigerten RNA-Expression von TLR4.

31 c) Im Vergleich zu nicht-infizierten Gerbils (1) konnte eine Infektion mit *H. pylori* (2, 3, 4, 5) die RNA-Expression von TLR9 signifikant erhöhen und durch den Einsatz von Cholera-Toxin als Adjuvanz (4, 5) wurde TLR9-RNA auch gegenüber der Infektionskontrolle (2) gesteigert exprimiert.

\* = nicht-infiziert (1) vs. infiziert (2, 3, 4, 5); + = infiziert/nicht-immunisiert (2) vs. infiziert/immunisiert (3, 4, 5);  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=6$

Wie in Abbildung 31 a) gezeigt, konnte die erhöhte RNA-Expression von TLR2 gegenüber der Kontrollgruppe (1) nur durch eine Immunisierung mit Cholera-Toxin als Adjuvanz (4, 5) nachgewiesen werden. Eine Infektion mit *H. pylori* (2, 3, 4, 5) führte, wie in Abbildung 31 b) dargestellt, zu einer statistisch signifikant gesteigerten Expression von TLR4-RNA im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1). In Abbildung 31 c) ist gezeigt, wie durch die Infektion mit *H. pylori* (2, 3, 4, 5) eine gegenüber nicht-infizierten Tieren (1) erhöhte RNA-Expression von TLR9 beobachtet werden konnte. Durch den Einsatz von Cholera-Toxin als Adjuvanz (4, 5) wurde TLR9-RNA auch im Vergleich zur Infektionskontrolle (2) gesteigert exprimiert.

### 5.2.7.2.5 Übersicht und Zusammenfassung: RNA-Expressionsprofil des Magens nach acht Wochen Infektionsdauer

	BB + PBS i.n. (1)	Infektion Hp + PBS i.n. (2)	Infektion Hp + Lysat/CpG i.n. (3)	Infektion Hp + Lysat/CT i.n. (4)	Infektion Hp + Lysat/CpG/CT i.n. (5)
<b>Proinflammatorische Zytokine</b>					
IFN- $\gamma$	-	*	*	*+	*
IL-6	-	*	*	*+	*+
IL-1 $\beta$	-	*	*	*+	*+
TNF	-	*	*	*+	*+
IL-12p35	-	-	-	*+	*+
IL-12p40	-	-	-	*+	*+
IL-18	-	*	*	-	*
MIF	-	*	*	*+	*+
<b>Antiinflammatorische Zytokine</b>					
IL-4	-	-	-	-	-
IL-10	-	-	-	*+	*
<b>Chemokine und iNOS</b>					
KC	-	*	*+	*+	*
Mip-2	-	-	*+	*+	*+
iNOS	-	*	*	*+	*
<b>Toll-like Rezeptoren</b>					
TLR2	-	-	-	*+	*
TLR4	-	*	*	*	*
TLR5	-	-	-	-	-
TLR9	-	*	*	*+	*+

**Tabelle 10: Übersicht RNA-Expressionsprofil des Magens nach acht Wochen Infektionsdauer**

Übersicht über die RNA-Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, iNOS und TLRs im Magengewebe.

- = Expression nicht signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1)

\* = Expression signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1)

+ = Expression signifikant erhöht im Vergleich zur Infektionskontrolle (2)

Durch eine Infektion mit *H. pylori* konnte, wie in Tabelle 10 gezeigt, nach acht Wochen Infektionsdauer die RNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF, IL-18 und MIF im Magen signifikant gesteigert werden. Der Einsatz von Cholera-Toxin als Adjuvanz führte zu einem starken Anstieg der Expression von IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF und MIF. IL-12p35- und IL-12p40-RNA wurde nach acht Wochen nur aufgrund des Einsatzes von Cholera-Toxin als Adjuvanz gesteigert exprimiert. Die erhöhte Expression des Leitzytokins der Th2-Immunantwort IL-4, konnte im Vergleich zu den Kontrollgruppen nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde durch die Verwendung von Cholera-Toxin als Adjuvanz gegenüber den Kontrollgruppen die gesteigerte Expression des regulatorisch wirksamen IL-10 induziert. Die beiden Chemokine KC und Mip-2 zeigten eine verstärkte RNA-Expression, wobei KC in allen infizierten Tieren und Mip-2 nur nach Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat nachgewiesen werden konnte. Die RNA-Expression von iNOS lies auf erhöhten nitrosativen Stress in allen infizierten Gerbils schließen. Durch die Verwendung von Cholera-Toxin als Adjuvanz konnte die Expression von TLR-2-RNA signifikant gesteigert werden. Eine Infektion mit *H. pylori* führte zu einer erhöhten RNA-Expression von TLR4, ebenso wie TLR9. Die Expression von TLR9 wurde durch den Einsatz von Cholera-Toxin als Adjuvanz noch verstärkt. Für TLR5 konnte acht Wochen nach der Infektion gegenüber den Kontrollgruppen keine gesteigerte Expression beobachtet werden.

Nach acht Wochen Infektionsdauer führte eine Infektion mit *H. pylori* in diesem experimentellen Ansatz im Vergleich zu nicht-infizierten Gerbils zu einer Vielzahl verstärkt exprimierter proinflammatorischer Zytokine, Chemokine, iNOS und TLRs. Die Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat zeigte zu diesem Zeitpunkt im Vergleich dazu kaum noch Wirkung, lediglich die Expression der beiden Chemokine KC und Mip-2 war infolgedessen gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht. Die Verwendung von CpG-ODN als Adjuvanz zeigte bei intranasaler Verabreichung keine immunmodulierende Wirkung, während Cholera-Toxin zu einem starken Anstieg der RNA-Expression von hauptsächlich proinflammatorischen Zytokinen und auch gleichzeitig des regulatorisch wirksamen IL-10 führte.

### 5.3 Modulation der *H. pylori*-induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit Dendritischen Zellen

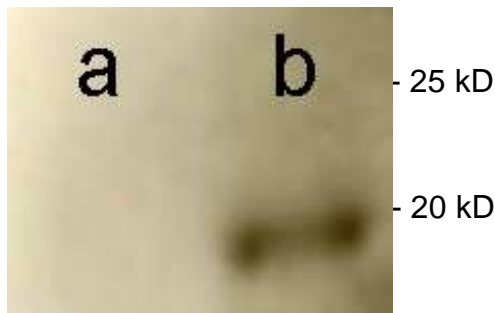
Dendritische Zellen (DCs) spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von angeborener und adaptiver Immunantwort. In der initialen und unspezifischen Reaktion des Immunsystems sezernieren sie nach Kontakt mit Antigenen Zytokine, die zu einer Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems führen. Die Hauptaufgabe von Dendritischen Zellen liegt jedoch in der Prozessierung von Antigenen und deren Präsentation auf der Zelloberfläche. Sie fungieren daher als sogenannte Antigen-präsentierende Zellen. DCs können auch *in vitro* mit Antigenen gepulst und in den Wirt zurück transferiert werden. „Pulsen“ wird der experimentelle Vorgang genannt, bei dem durch *in vitro*-Kontakt mit Antigenen deren Aufnahme und Präsentation an der Zelloberfläche von DCs induziert wird. Diese Vorgehensweise wurde bereits für eine Reihe von experimentellen Tumorstimmulierung (van de Loosdrecht et al., 2009; Fujita et al., 2009), aber auch im Einsatz gegen Infektionserreger (McCormick et al., 2008) als Immunisierungsstrategie gebraucht. Da eine Infektion mit *H. pylori* bedingt durch bakterielle Faktoren zu einer „falschen“ Immunantwort führt, könnte das Pulsen von Dendritischen Zellen mit Erregerbestandteilen noch vor dem Kontakt mit dem Bakterium zu einer protektiven Reaktion des Immunsystems führen. Zunächst musste jedoch überprüft werden, ob eine Herstellung von vitalen DCs aus Gerbils unter Verwendung etablierter Methoden für das Mausmodell überhaupt möglich ist.

#### 5.3.1 Expression von GM-CSF, Differenzierung und Charakterisierung von Dendritischen Zellen aus *Meriones unguiculatus*

Die Differenzierung von Dendritischen Zellen geschieht *in vivo* aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks. Daher hat sich bei Mäusen folgendes experimentelles Vorgehen bewährt: Die Knochenmarkszellen werden aus den Ober- und Unterschenkelknochen herausgespült und je nach verwendetem Protokoll einige Tage mit GM-CSF inkubiert (Inaba et al., 2001; Son et al., 2002; Rossner et al., 2005; Nikolic et al., 2003). GM-CSF, der sogenannte Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor, ist ein

Wachstumsfaktor, der die Ausdifferenzierung von APZs aktiviert. In Vorversuchen führte die Verwendung von kommerziell erhältlichem murinen GM-CSF im Tiermodell von *Meriones unguiculatus* zu keiner Differenzierung der Knochenmarkszellen. Zur Herstellung von Gerbil-DCs war also die Expression von artspezifischem GM-CSF notwendig.

#### 5.3.1.1 Detektion der Proteinexpression von GM-CSF durch Western Blot



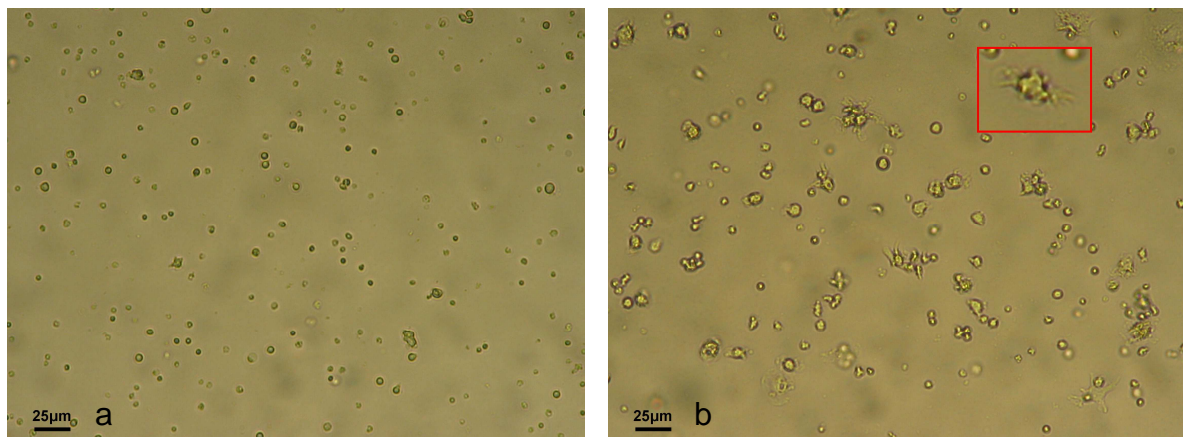
**Abbildung 32: Detektion der Proteinexpression mithilfe eines 6xHis-Tags durch Western Blot in (a) nicht-transfizierten und (b) mit Gerbil GM-CSF (17,7kDa) transfizierten HEK293T Zellen**

HEK293T Zellen wurden gemäß der Kalziumphosphat-Präzipitations-Methode mit a) nur Expressionsplasmid und b) Expressionsplasmid mit integriertem GM-CSF transfiziert. Um die Detektion des Gerbil GM-CSFs zu ermöglichen, wurde zuvor ein 6xHis-Tag C-Terminal an das Gen kloniert. Die Expression des Proteins erfolgte für etwa 48 Stunden, danach wurde der Zellkulturüberstand filtriert und für einen Western Blot nach Anleitung des Herstellers verwendet.

HEK293T Zellen wurden gemäß der Kalziumphosphat-Präzipitations-Methode mit dem Expressionsplasmid pQCXIP transfiziert, in welches zuvor das Gen für Gerbil GM-CSF mit einem 6xHis-Tag kloniert wurde. Nach sechs Stunden wurde das Zellkulturmedium gewechselt und die Zellen konnten für weitere 48 Stunden wachsen, um das Protein zu exprimieren. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und filtriert. Um die Expression von Gerbil GM-CSF nachweisen zu können, wurde zum Zwecke der Detektion an den C-Terminus des Proteins ein 6xHis-Tag kloniert. Um einen eventuell störenden Einfluss zu verhindern, wurde für funktionelle Analysen nur das native Protein ohne Tag benutzt. Der Nachweis von GM-CSF im Zellkulturüberstand erfolgte mithilfe von SDS Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot. Als Negativkontrolle wurde der Expressionsvektor pQCXIP ohne Insertion von GM-CSF benutzt. Die Detektion

von GM-CSF ist in Abbildung 32 gezeigt, das 17,7kDa Protein wurde im Gegensatz zur Negativkontrolle stark exprimiert.

### 5.3.1.2 Morphologische Charakterisierung von GM-CSF-behandelten Knochenmarkszellen



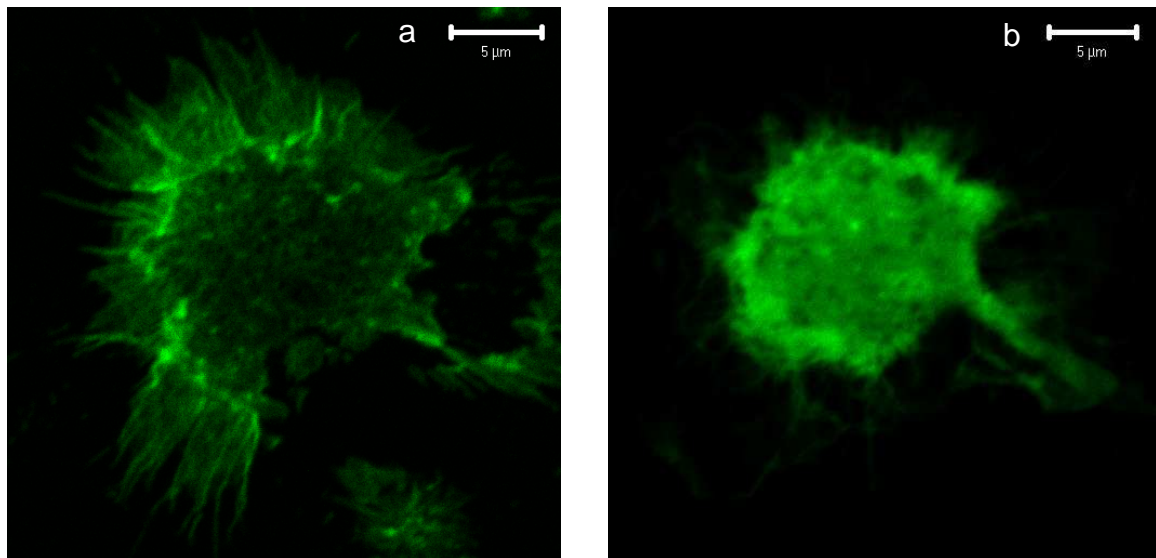
**Abbildung 33: Analyse der morphologischen Veränderung von Knochenmarkszellen nach sieben Tagen Wachstum (a) ohne oder (b) mit Zugabe von Gerbil GM-CSF**

Knochenmarkszellen wurden für sieben Tage mit (a) nur Zellkulturmedium oder (b) Zugabe von 10% Zellkulturüberstand von GM-CSF-exprimierenden HEK293T Zellen inkubiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem invertierten Lichtmikroskop. Zytoplasmatische Fortsätze und die Ausbildung von Kolonien, charakteristisch für DCs, konnte nur in den mit GM-CSF inkubierten Zellen beobachtet werden.

Die rote Box ist ein 2fach gezoomter Ausschnitt einer typischen Dendritischen Zelle.

Die Bioaktivität des Zellkulturüberstands wurde an einer *in vitro* Kultur von Knochenmarkszellen getestet. Das Knochenmark wurde geerntet und  $2 \times 10^6$  Zellen/ml für sieben Tage mit 10% GM-CSF-haltigem Zellkulturüberstand oder nur Zellkulturmedium als Negativkontrolle inkubiert. Alle 2-3 Tage wurde die Hälfte des Mediums ausgetauscht. Nach sieben Tagen zeigten die in GM-CSF inkubierten Zellen, im Gegensatz zur Negativkontrolle, die typische Morphologie von Dendritischen Zellen. Wie in Abbildung 33 gezeigt, konnten verzweigte zytoplasmatische Fortsätze und die Ausbildung von Kolonien nur in den Zellen beobachtet werden, die mit rekombinantem GM-CSF inkubiert wurden.

### 5.3.1.3 Strukturelle Charakterisierung des Aktin-Zytoskeletts



**Abbildung 34: Färbung des Aktin-Zytoskeletts mit FITC-Phalloidin von (a) immaturren oder (b) maturateden Dendritischen Zellen**

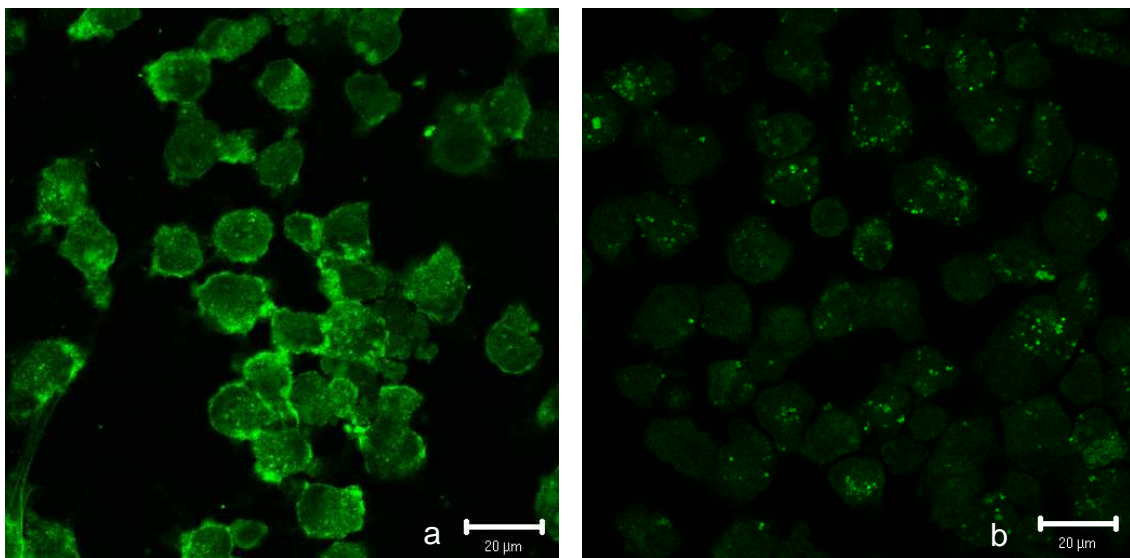
Knochenmarkszellen aus dem Gerbil wurden für sieben Tage mit 10% Zellkulturüberstand aus GM-CSF-exprimierenden HEK293T Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen für 24 Stunden (a) ohne oder (b) mit *E. coli* LPS inkubiert. Der Kontakt mit dem Antigen führte zu charakteristischen Veränderungen in der Zelle, dieser Vorgang wird Maturierung genannt. Dementsprechend handelt es sich bei DCs ohne Antigen-Kontakt um immature Zellen, nach Kontakt spricht man von maturateden DCs. Die Färbung des Zytoskeletts erfolgte mit FITC-Phalloidin, einem Marker für F-Aktin. Die fluoreszente Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Lasermikroskop. Immature DCs zeigten charakteristische zytoplasmatische Fortsätze (a), die nach Inkubation mit *E. coli* LPS nicht mehr sichtbar waren (b).

Zur strukturellen Charakterisierung des Aktin-Zytoskeletts wurden Knochenmarkszellen für sieben Tage mit 10% GM-CSF-haltigem Zellkulturüberstand inkubiert. Die Zellen wurden auf spezielle Objektträger aufgebracht, dort erfolgte für 24 Stunden eine Inkubation mit oder ohne *E. coli* LPS. LPS ist dafür bekannt, in DCs eine Maturierung zu induzieren (De Smedt et al., 1996; Granucci et al., 1999). Dabei handelt es sich um den zentralen Vorgang bei Dendritischen Zellen, der ihnen die Regulation der Immunantwort ermöglicht. Immature DCs können sich durch die Aufnahme von Antigenen zu maturateden und damit Antigen-präsentierenden Zellen entwickeln, wobei eine Reihe von charakteristischen phänotypischen und funktionellen Veränderungen ablaufen. Unter anderem kommt es auch zu einer morphologischen Umgestaltung der Dendriten und einer Restrukturierung des Zytoskeletts.



Nach der Inkubation mit *E. coli* LPS wurden die Zellen fixiert und mit FITC-Phalloidin gefärbt, einem Marker für F-Aktin. Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Lasermikroskop. Wie in Abbildung 34 a) gezeigt, waren bei immaturren DCs charakteristische zytoplasmatische Fortsätze sichtbar, die der Aufnahme von Antigenen dienen. Durch die Inkubation mit *E.coli* LPS kam es, wie in Abbildung 34 b) gezeigt, zur Maturierung der Zellen, die mit einer Veränderung der Dendriten und Umstrukturierung des Zytoskeletts einherging.

#### 5.3.1.4 Phagozytose von GFP-exprimierendem *H. pylori*



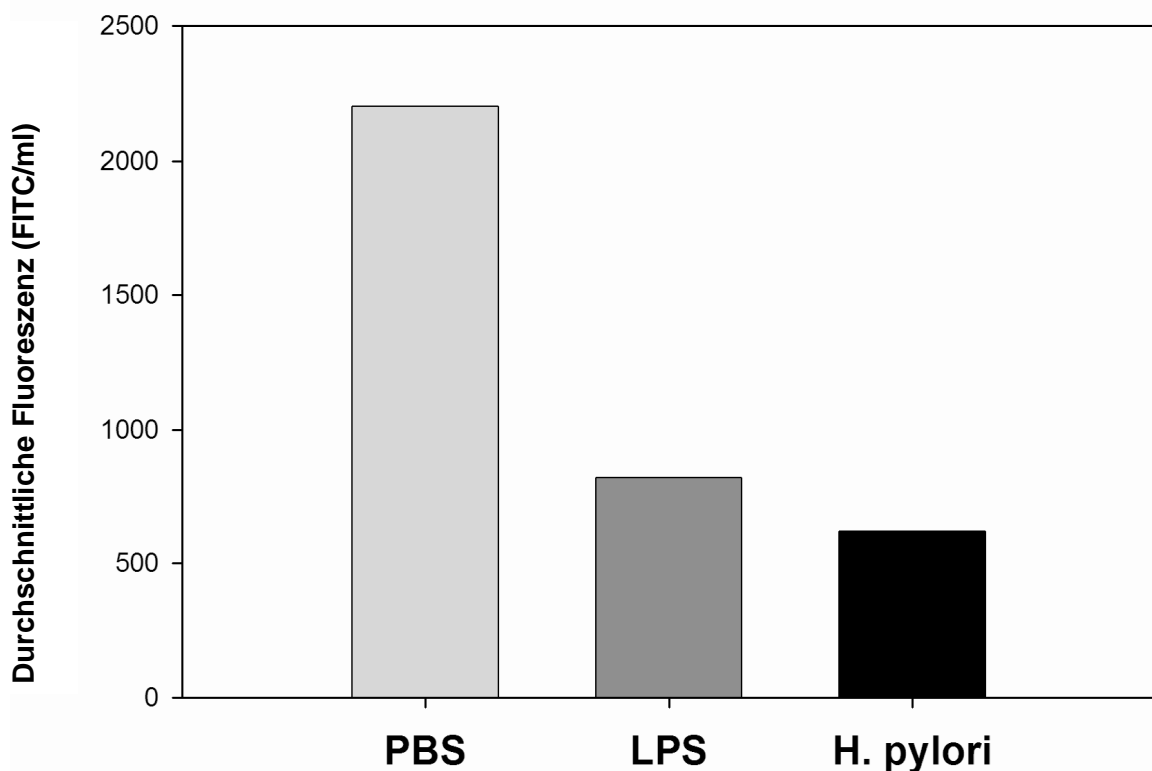
**Abbildung 35: Phagozytose von GFP-exprimierendem *H. pylori* durch (a) immature oder (b) mature Dendritische Zellen**

Die Dendritischen Zellen wurden für 24h (a) ohne oder (b) mit *E. coli* LPS inkubiert. Der Kontakt mit dem Antigen führte zur Maturierung der DCs. Danach wurden die Zellen für zwei Stunden mit GFP-exprimierendem *H. pylori* inkubiert und je nach Reifegrad der DCs kam es dabei zur Phagozytose von fluoreszenzmarkierten bakteriellen Bestandteilen. Die fluoreszente Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Lasermikroskop. Die Maturierung von DCs geht mit einer Reihe charakteristischer Veränderungen einher, unter anderem auch einer reduzierten Fähigkeit zur Antigen-Internalisierung. In reifen DCs (b) kam es daher im Gegensatz zu immaturren DCs (a) zu einer stark verminderten intrazellulären Aufnahme von *H. pylori*-Bestandteilen.

Die Dendritischen Zellen wurden wie zuvor hergestellt (siehe 5.3.1.3) und für 24h ohne bzw. mit *E. coli* LPS inkubiert und danach für zwei Stunden mit GFP-exprimierendem, vitalen *H. pylori*. Dabei kommt es je nach Reifegrad der DCs zur

Phagozytose von fluoreszenzmarkierten bakteriellen Bestandteilen. Wie in Abbildung 35 a) gezeigt, verfügten immature DCs über eine ausgeprägte Phagozytosefähigkeit der GFP-markierten *H. pylori*-Antigene. Die Maturierung von DCs führte, wie in Abbildung 35 b) dargestellt, zu einem Verlust der Befähigung zur Internalisierung von Antigenen, in reifen DCs konnten deshalb intrazellulär deutlich weniger fluoreszenzmarkierte *H. pylori*-Bestandteile nachgewiesen werden.

### 5.3.1.5 Endozytose von FITC-Dextran



**Abbildung 36: Endozytose von FITC-Dextran nach Inkubation der Dendritischen Zellen mit PBS, LPS und lebendem *H. pylori***

Die Dendritischen Zellen wurden für 24 Stunden mit PBS, *E. coli* LPS oder lebendem *H. pylori* inkubiert. Die Endozytosefähigkeit wurde durch die Inkorporation von FITC-Dextran und Zählung der durchschnittlichen Fluoreszenz mithilfe der FACS-Analyse gemessen. Dendritische Zellen, die mit LPS und *H. pylori* inkubiert wurden, verfügten aufgrund des Maturierungsprozesses über reduzierte Fähigkeiten zur Endozytose. *H. pylori* ist also ebenso wie *E. coli* LPS in der Lage, die Maturierung von DCs zu induzieren.

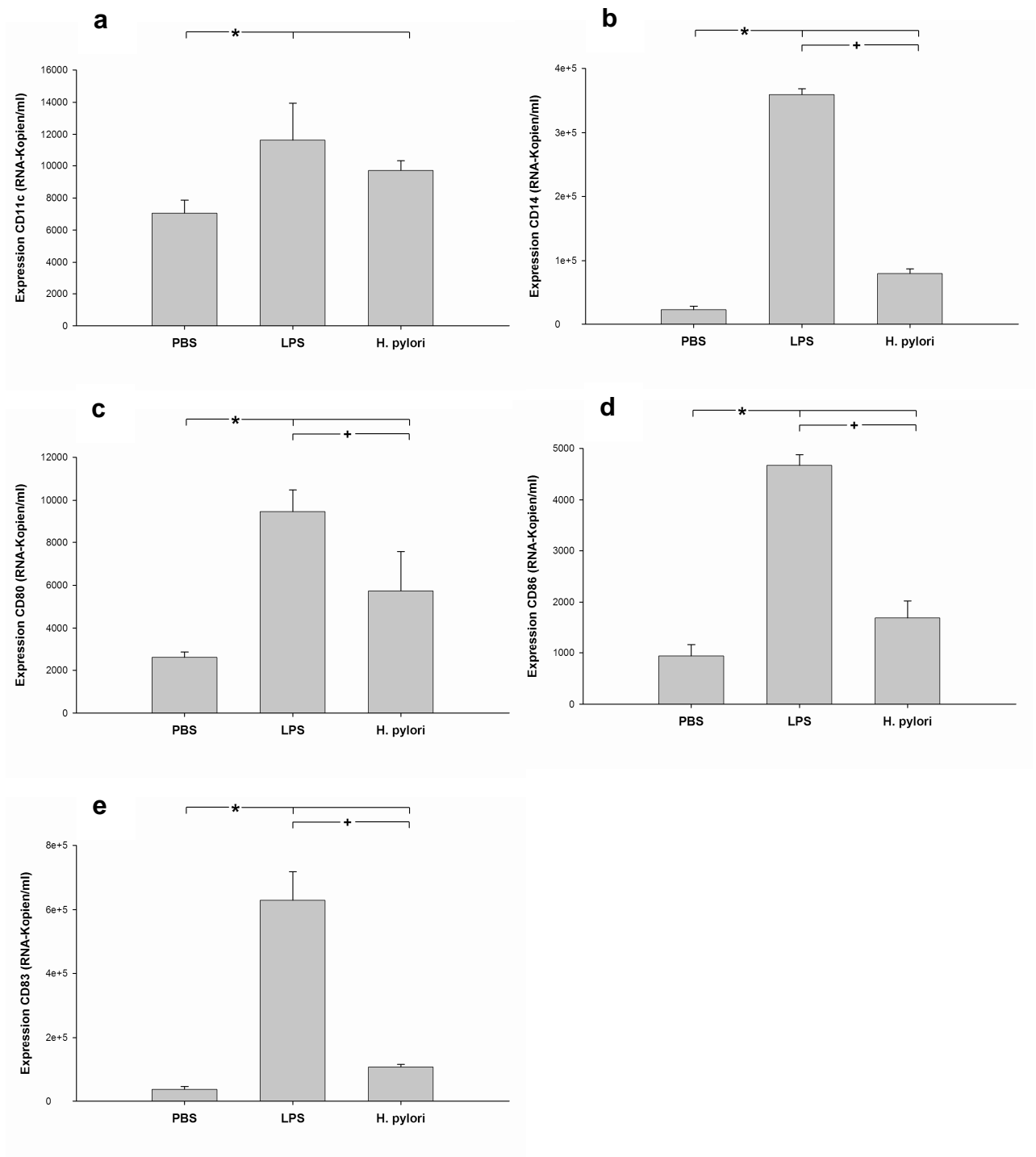
Abgebildet ist der jeweilige Mittelwert mit n=3

Die Dendritischen Zellen wurden wie zuvor hergestellt (siehe 5.3.1.3) und für 24 Stunden mit PBS als Negativkontrolle, *E. coli* LPS oder lebendem *H. pylori* inkubiert. Helicobacter ist wie LPS in der Lage, die Maturierung von DCs zu induzieren (Kranzer et al., 2004). Immature Dendritische Zellen zeigten eine ausgeprägte Endozytosefähigkeit, die durch die Internalisierung von FITC-Dextran in Abbildung 36 gezeigt wird. Die über den Mannose-Rezeptor vermittelte Endozytose ist für DCs ein wichtiger Vorgang zur Aufnahme von Antigenen zur späteren Präsentation an Lymphozyten (Hackstein et al., 2002). LPS und *H. pylori* führten beide zur Maturierung der DCs, wodurch aufgrund dieses Prozesses ihre Endozytosefähigkeiten stark reduziert wurden.

#### **5.3.1.6 Molekulare Charakterisierung**

Die Maturierung von DCs ist vom verwendeten Antigen abhängig. *E. coli* LPS ist ein oft verwendetes Stimulanz, das zur Reifung von DCs führt (Cho et al., 2010). Im direkten Vergleich mit *H. pylori* lassen sich jedoch auf molekularer Ebene charakteristische Unterschiede feststellen (Kranzer et al., 2004). Für eine detaillierte Analyse von Oberflächenmolekülen, Zytokinen, Chemokinen und Toll-like Rezeptoren von Gerbils, wurde das bisher in dieser Arbeit verwendete quantitative PCR-System adaptiert.

Die molekulare Charakterisierung der Dendritischen Zellen (Herstellung der DCs siehe: 4.1.5.2 Differenzierung von Dendritischen Zellen) erfolgte mit quantitativer TaqMan®-PCR. DCs wurden für acht Stunden mit PBS als Negativkontrolle, *E. coli* LPS oder lebendem *H. pylori* inkubiert. Jeweils vier Versuchsansätze wurden zur Extraktion der RNA vereint, revers transkribiert und für die TaqMan®-PCR verwendet.



**Abbildung 37: RNA-Expression von Oberflächenmolekülen**

Die Dendritischen Zellen wurden für acht Stunden mit PBS als Kontrolle, *E. coli* LPS oder lebendem *H. pylori* inkubiert. Die Extraktion der RNA, Reverse Transkription und quantitative PCR (TaqMan®) wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

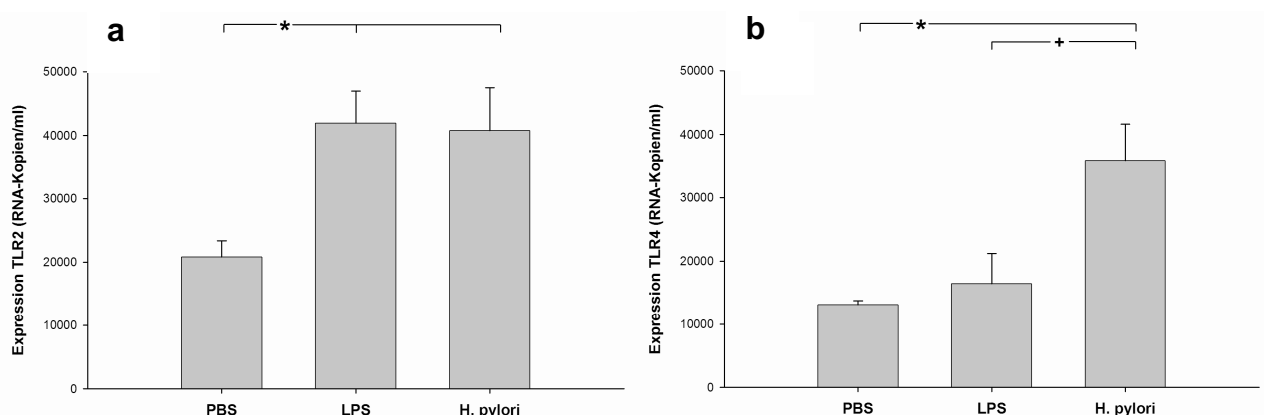
37 a) Im Vergleich zur Kontrolle war die RNA-Expression von CD11c nach Inkubation mit LPS oder *H. pylori* signifikant erhöht.

37 b) + e) Für CD14 und CD83 konnte gegenüber der Kontrolle eine gesteigerte Expression nach Inkubation mit *H. pylori* festgestellt werden, diese wurde jedoch durch den Einsatz von LPS um ein Vielfaches übertroffen.

37 c) + d) Die Expression von CD80- und CD86-RNA war im Vergleich zur Kontrolle nach Inkubation mit *H. pylori* und LPS signifikant erhöht.

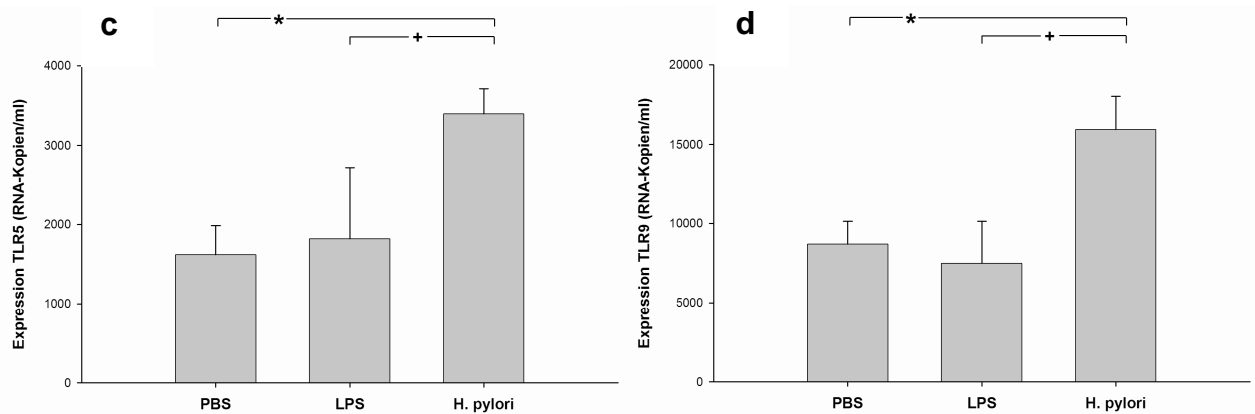
\* = PBS vs. LPS oder *H. pylori*; + = LPS vs. *H. pylori*;  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=4$

Die Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen ist charakteristisch für Dendritische Zellen, so wie in Abbildung 37 gezeigt. CD11c, ein Integrin, welches man auf den meisten Dendritischen Zellen findet, wurde im Gegensatz zur PBS-Negativkontrolle statistisch signifikant in den Versuchsansätzen exprimiert, die zuvor für acht Stunden mit LPS oder *H. pylori* inkubiert wurden. Eine statistisch signifikant gesteigerte RNA-Expression von CD14 und CD83 konnte nach Inkubation mit *H. pylori* nachgewiesen werden. Die Inkubation mit LPS, welches in der Lage ist die Maturierung von DCs einzuleiten, führte jedoch im Vergleich dazu zu einer um ein Vielfaches erhöhten Expression. CD14 ist ein Oberflächenprotein, das als Zielmolekül für LPS fungiert (Gioannini et al., 2007), während CD83 eines der bekanntesten Oberflächenmoleküle für komplett ausgereifte DCs darstellt (Prechtel et al., 2007a; Prechtel et al., 2007b). CD80 und CD86 fungieren als kostimulatorische Moleküle in der T-Zell-Aktivierung und ihre RNA-Expression konnte nach Inkubation mit *H. pylori* und LPS signifikant erhöht werden.



**Abbildung 38: RNA-Expression von Toll-like Rezeptoren**

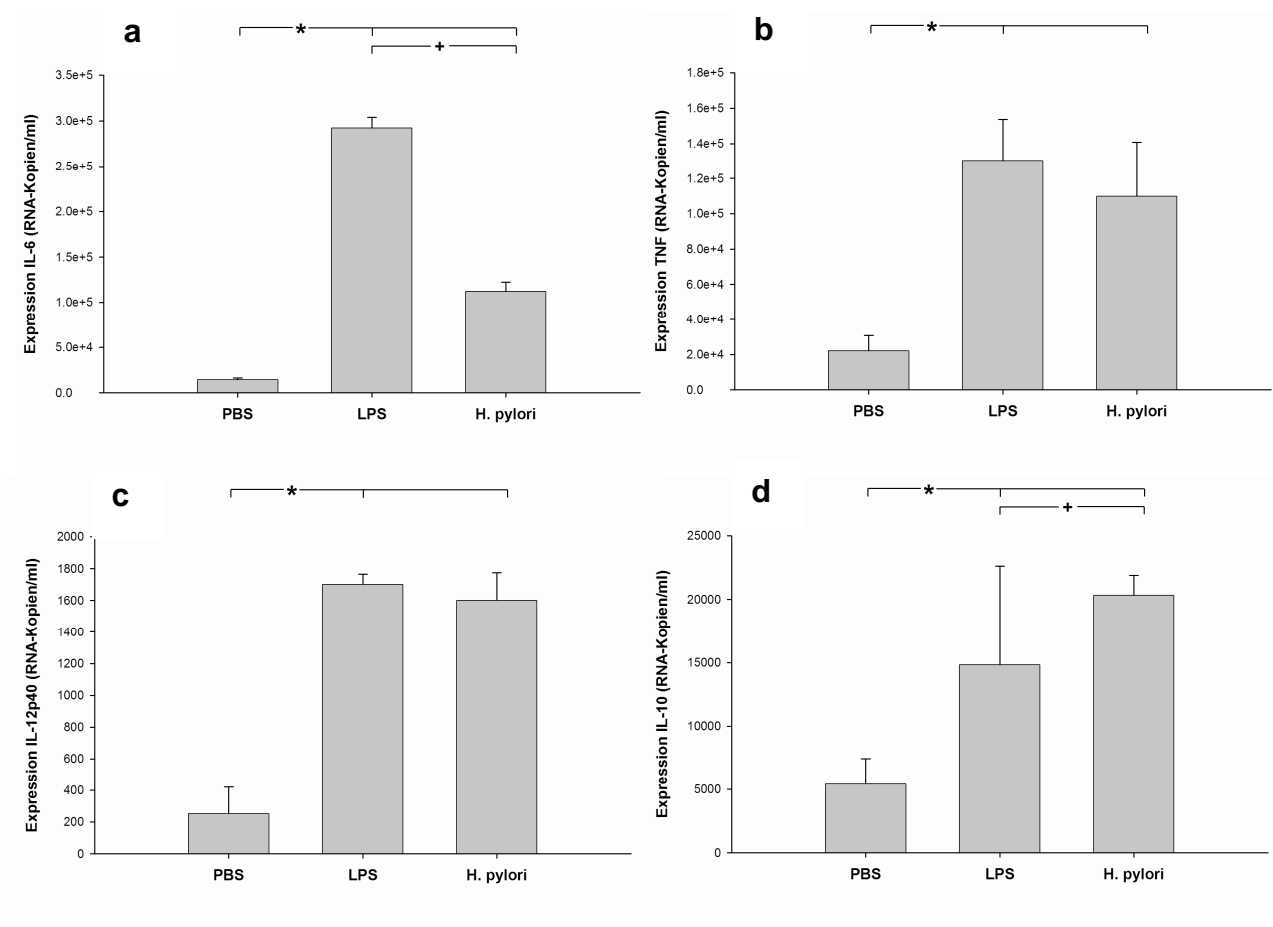
38 a) Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Expression von TLR2-RNA nach Inkubation mit LPS oder *H. pylori* signifikant erhöht.



38 b) + c) + d) Nach Inkubation mit *H. pylori* kam es zu einer gesteigerten RNA-Expression von TLR4, TLR5 und TLR9, welche gegenüber der Kontrollgruppe durch den Einsatz von LPS nicht beobachtet werden konnte.

\* = PBS vs. LPS oder *H. pylori*; + = LPS vs. *H. pylori*;  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=4$

Toll-like Rezeptoren sind als Oberflächenmembranrezeptoren in der Lage, Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs) zu erkennen. In Abbildung 38 ist die RNA-Expression dieser Rezeptoren nach acht Stunden Inkubation mit LPS oder lebendem *H. pylori* gezeigt. TLR2 verfügt über ein weites Spektrum an Zielmolekülen und es kam sowohl durch Inkubation mit LPS als auch mit *H. pylori* zu einer unspezifischen, aber gegenüber der Negativkontrolle signifikant erhöhten Expression von TLR2-RNA. Eine gesteigerte Expression des TLR4-Rezeptors, der normalerweise für die Erkennung von LPS verantwortlich ist, konnte in diesem Versuchsaufbau statistisch signifikant nur in mit *H. pylori* inkubierten DCs nachgewiesen werden. Dieser Effekt wurde auch für die RNA-Expression von TLR5 beobachtet. Der Rezeptor reagiert auf das Flagellin von begeißelten Bakterien und dementsprechend führte nur die Stimulation mit dem begeißelten Bakterium *H. pylori* zu einer statistisch signifikanten Expression von TLR5. TLR9 erkennt unmethylierte CpG-Motive in bakterieller DNA und auch hier kam es nur nach Inkubation mit *H. pylori* gegenüber der Negativkontrolle zu einer gesteigerten RNA-Expression.



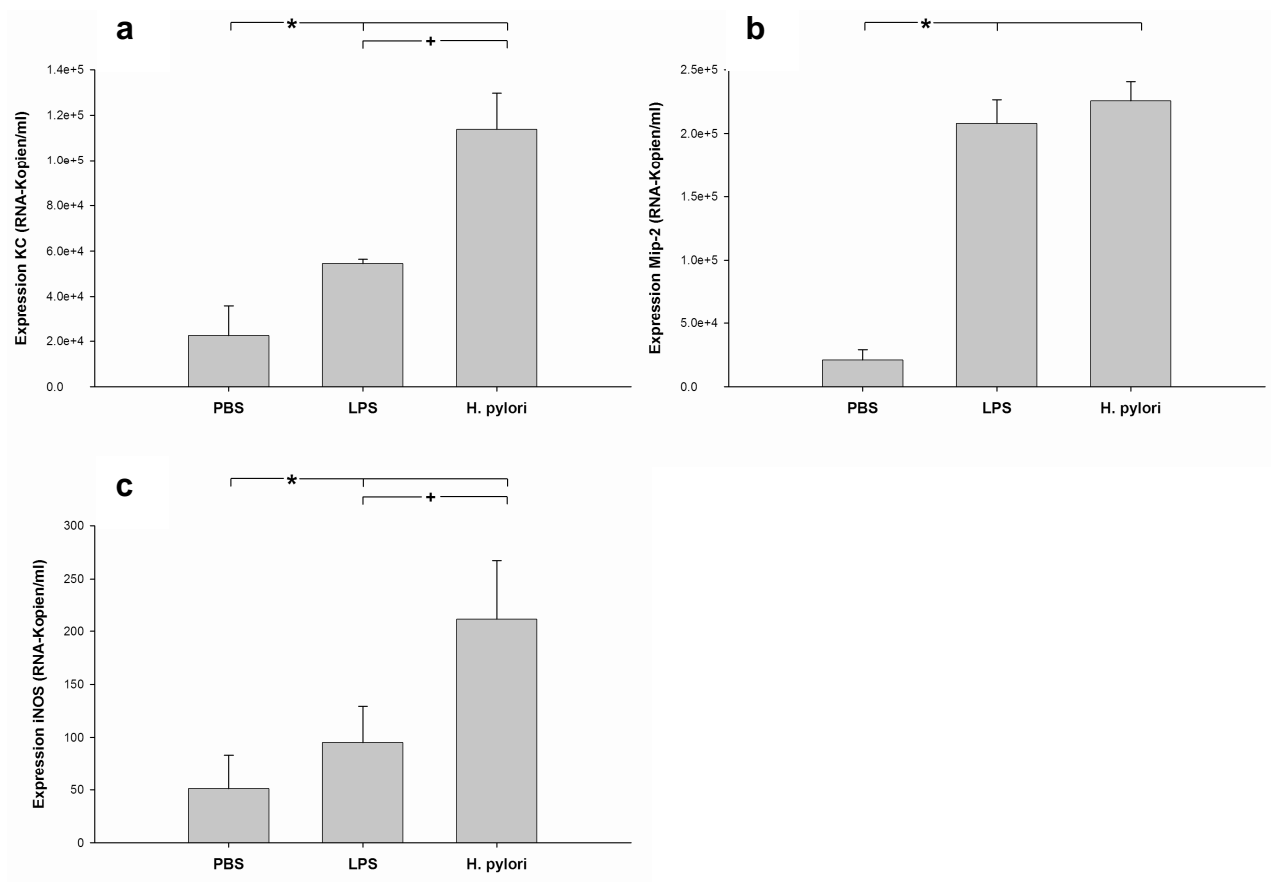
### Abbildung 39: RNA-Expression von Zytokinen

39 a) Im Vergleich zur Kontrollgruppe kam es nach der Inkubation mit *H. pylori* zu einer signifikant erhöhten Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6, dies wurde jedoch durch den Einsatz von LPS um ein Vielfaches übertroffen.

39 b) + c) + d) Die RNA-Expression von TNF, IL-12p40 und IL-10 konnte gegenüber der Kontrollgruppe sowohl durch Inkubation mit LPS als auch mit *H. pylori* signifikant erhöht werden.

\* = PBS vs. LPS oder *H. pylori*; + = LPS vs. *H. pylori*;  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n = 4$

Die Stimulation von Dendritischen Zellen führte zur RNA-Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (Abbildung 39). Die Inkubation von DCs mit *H. pylori* resultierte im Vergleich zur Negativkontrolle in einer signifikant erhöhten RNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6. Durch den Einsatz von LPS wurde dies jedoch um ein Vielfaches übertroffen. Die frühen proinflammatorisch wirksamen Zytokine TNF und IL-12p40 zeigten nach Inkubation mit LPS und *H. pylori* gegenüber der Negativkontrolle eine signifikant erhöhte RNA-Expression. Dies konnte auch für das regulatorische Zytokin IL-10 beobachtet werden.



**Abbildung 40: Expression von Chemokinen und iNOS**

40 a) + c) Durch den Einsatz von LPS konnte im Vergleich zur Negativkontrolle eine erhöhte Expression von KC- und iNOS-RNA beobachtet werden, die Inkubation mit *H. pylori* führte demgegenüber zu einem weiteren Anstieg.

40 b) Die Inkubation mit LPS und *H. pylori* führte gegenüber der Kontrolle zu einer gesteigerten RNA-Expression von Mip-2.

\* = PBS vs. LPS oder *H. pylori*; + = LPS vs. *H. pylori*;  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=4$

Die beiden Chemokine KC und Mip-2 stellen die murinen Homologe zum humanen IL-8 dar. Eine Infektion mit *H. pylori* führt beim Menschen normalerweise zu einer erheblichen Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-8 (Naito et al., 2008). Diese Beobachtung konnte, wie in Abbildung 40 gezeigt, auch für KC und Mip-2 bestätigt werden, welche im Vergleich zur Negativkontrolle eine statistisch signifikant gesteigerte Expression nach Stimulation mit *H. pylori* aufwiesen. Das für nitrosativen Stress verantwortliche Enzym iNOS wurde nach Inkubation der DCs mit LPS gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant exprimiert, eine Stimulation mit *H. pylori* konnte dies jedoch noch steigern.



Zusammenfassend ergab sich also eine für Dendritische Zellen charakteristische RNA-Expression der Oberflächenproteine CD11c, CD14, CD80, CD86 und CD83. In Bezug auf Toll-like Rezeptoren zeigte sich eine erhöhte Expression von TLR2, 4, 5 und 9 vor allem nach einer Stimulation mit lebendem *H. pylori*. Während das proinflammatorische Zytokin IL-6 vor allem nach Kontakt mit LPS exprimiert wurde, konnte die gesteigerte TNF- und IL-12p40-Expression sowohl durch Inkubation mit LPS, als auch mit lebendem *H. pylori* nachgewiesen werden; ebenso wie die RNA-Expression des regulatorisch wirksamen IL-10. Die beiden Chemokine KC und Mip-2 zeigten ebenfalls eine erhöhte Expression nach Inkubation mit LPS und *H. pylori*. Die RNA-Expression des vor allem in der angeborenen Immunantwort wirksamen iNOS, konnte vor allem durch eine Stimulation mit *H. pylori* stark gesteigert werden. Die Herstellung von vitalen Dendritischen Zellen aus dem Gerbil ist also *in vitro* möglich, allerdings musste vor dem Einsatz im Tiermodell der Erhalt ihrer funktionellen Eigenschaften bestätigt werden.

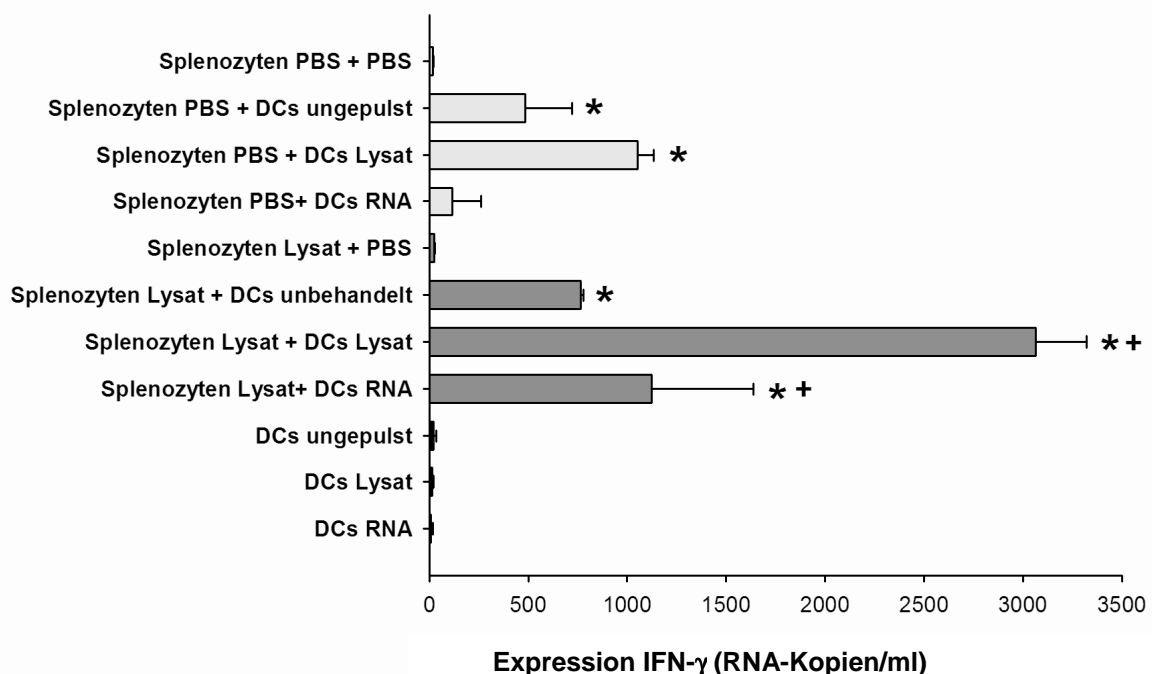
### 5.3.2 Stimulationsfähigkeit der Dendritischen Zellen *in vitro*

In den vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Herstellung von Dendritischen Zellen *in vitro* aus dem Gerbil möglich ist. Die Hauptaufgabe von DCs ist die Präsentation von prozessierten Antigenen an ihrer Zelloberfläche. Durch Kontakt mit Lymphozyten, vor allem T-Zellen, kommt es zu deren Aktivierung. Daraufhin sezernieren sie eine Vielzahl an immunologisch wirksamen Proteinen, die den weiteren Verlauf der Immunantwort prägen. Diese sogenannten T-Helfer-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Infektion mit *H. pylori* (Goll et al., 2007; O'Keeffe et al., 2008).

Um die Interaktion der in dieser Arbeit erzeugten DCs mit T-Zellen beobachten zu können, erfolgte eine Koinkubation der beiden Zelltypen und eine anschließende Analyse der Expression des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  durch quantitative TaqMan®-PCR. Die T-Zellen wurden zu diesem Zweck aus der Milz gewonnen. Der überwiegende Anteil der Milz besteht aus Lymphozyten, ca. 60% B-Zellen und über 30% T-Zellen (Schütz, 2004). Trotz des relativ niedrigen Anteils an T-Zellen, eignen sich Milzzellen in Einzelzellkultur als ideales Untersuchungssystem für zelluläre Immunantworten (Deml et al., 2004).

Da in dieser Arbeit die Reaktion des adaptiven Immunsystems untersucht werden sollte, wurde zuvor ein Immunisierungsexperiment mit *H. pylori*-Lysat durchgeführt. Die Injektion erfolgte in die Schwanzwurzel, da hier durch die Nähe zu peripheren Lymphknoten ein optimaler Kontakt mit den Antigenen ermöglicht wird. Nach drei Wochen erfolgte eine Auffrischungsinjektion und schließlich die Organentnahme. Dabei wurden die Milzen entnommen und für die Splenozytenkultur verwendet. Sie wurden entweder mit PBS als Negativkontrolle, ungepulsten DCs, mit *H. pylori*-Lysat-gepulsten DCs oder mit *H. pylori* RNA-gepulsten DCs inkubiert. Die für aktivierte T-Zellen charakteristische RNA-Expression von IFN- $\gamma$  wurde mithilfe einer TaqMan®-PCR gemessen.

Durch das Pulsen mit *H. pylori*-Lysat kommt es zur Maturierung der DCs (Kranzer et al., 2004; Kranzer et al., 2005). Der Einsatz von RNA-transfizierten DCs hat sich in der Arbeit von Bacci et al. als vielversprechende Vakkzinierungsstrategie bei Infektionen mit *Candida albicans* herausgestellt (Bacci et al., 2002). Durch das Pulsen von DCs mit Candida-RNA aus unterschiedlichen Entwicklungsstufen, konnte in Mäusen eine jeweils gegensätzliche Immunantwort induziert werden.



**Abbildung 41: Stimulationsfähigkeit der Dendritischen Zellen *in vitro***

Die Interaktion von Dendritischen Zellen mit T-Zellen wurde durch Koinkubation mit Splenozyten überprüft. Da in dieser Arbeit die Reaktion des adaptiven Immunsystems untersucht werden sollte,

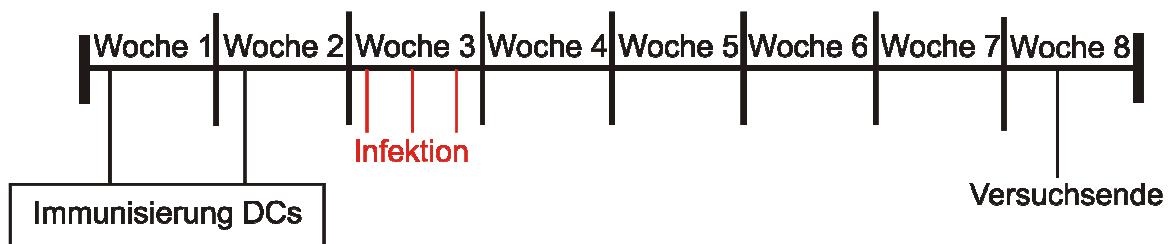
wurde den Gerbils vor der Entnahme der Milzen eine zweimalige Immunisierung mit PBS als Negativkontrolle bzw. *H. pylori*-Lysat verabreicht. Die Splenozyten wurden jeweils mit PBS als Negativkontrolle, mit ungepulsten, mit *H. pylori*-Lysat-gepulsten oder mit *H. pylori*-RNA-gepulsten DCs koinkubiert. Dabei zeigte sich eine gesteigerte Expression des für aktivierte T-Zellen charakteristischen Zytokins IFN- $\gamma$  bei mit *H. pylori*-Lysat immunisierten Gerbils, vor allem bei einer Koinkubation mit Lysat-gepulsten, aber auch bei mit *H. pylori*-RNA gepulsten Dendritischen Zellen. Eine Inkubation der DCs ohne Splenozyten führte zu keiner erhöhten Expression von IFN- $\gamma$ .

\* = Koinkubation mit PBS vs. Koinkubation mit DCs; + = Immunisierung mit PBS vs. Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat;  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=3$

Bei einer Inkubation von Dendritischen Zellen ohne Splenozyten als Negativkontrolle, konnte keine erhöhte Expression des Zytokins IFN- $\gamma$  beobachtet werden. Die Koinkubation von Splenozyten aus Gerbils, die mit PBS immunisiert wurden und unterschiedlich gepulsten DCs, führte zu einer nur leicht gesteigerten RNA-Expression von IFN- $\gamma$ . Durch den Einsatz von *H. pylori*-Lysat als Immunisierung kam es aufgrund des vorherigen Kontakts mit dem Antigen zu einer Reaktion des adaptiven Immunsystems und damit zu einer starken Expression von IFN- $\gamma$ , vor allem nach Koinkubation mit *H. pylori*-Lysat gepulsten DCs. *In vitro* konnte also durch den Kontakt der Splenozyten von zuvor mit Lysat immunisierten Gerbils und Lysat-gepulsten DCs eine starke Aktivierung von T-Zellen beobachtet werden.

### **5.3.3 Modulation der *H. pylori*-induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit Dendritischen Zellen**

Durch die vorhergehenden Experimente konnte bestätigt werden, dass die Herstellung von vitalen Dendritischen Zellen aus dem Gerbil möglich ist. Diese Zellen konnten *in vitro* mit Antigenen gepulst werden und führten dann zu einer unterschiedlichen Aktivierung von T-Zellen. Nun sollte im Rahmen eines Vakkzinierungsexperiments gezeigt werden, ob diese Effekte auch *in vivo* im Gerbil eine regulatorische Auswirkung auf die Infektion mit *H. pylori* haben. Dazu wurden DCs aus dem Gerbil mit PBS als Negativkontrolle, *H. pylori*-Lysat und *H. pylori*-RNA gepulst und wieder in die Tiere transferiert.

**Zeitlicher Ablauf:****Gruppeneinteilung:**

Gruppe (1): BB + PBS i.p. => keine Infektion, keine Behandlung

Gruppe (2): BB + DCs i.p. => keine Infektion, ungepulste DCs

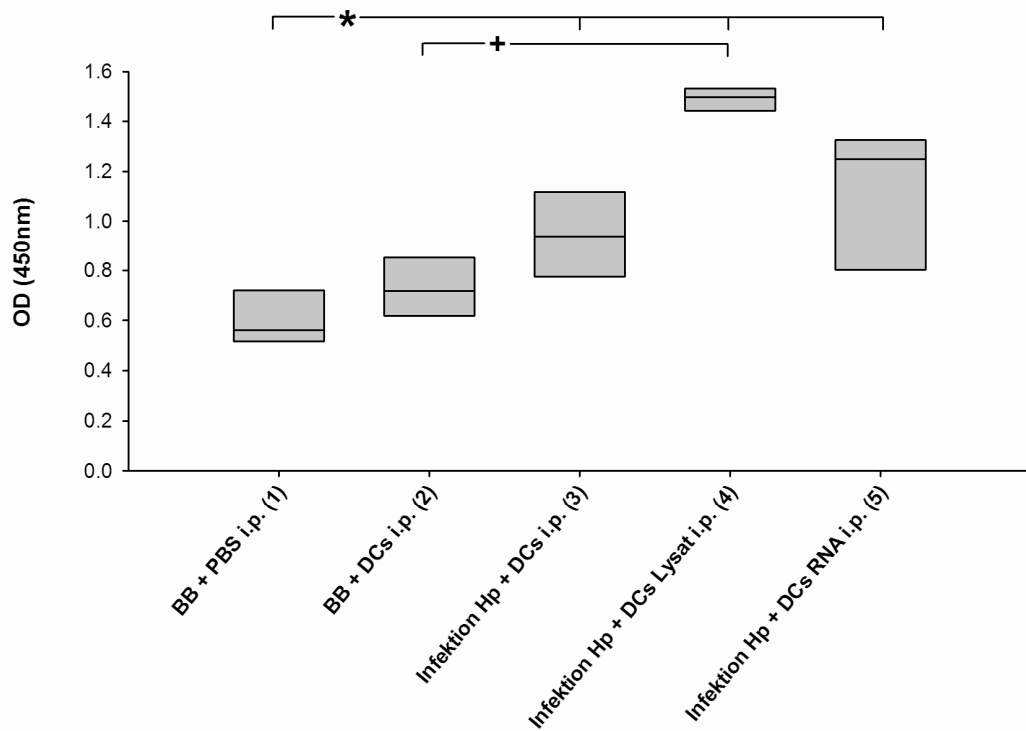
Gruppe (3): Infektion Hp + DCs i.p. => Infektion + ungepulste DCs

Gruppe (4): Infektion Hp + Dcs Lysat => Infektion + *H. pylori* Lysat-gepulste DCs

Gruppe (5): Infektion Hp + Dcs RNA => Infektion + *H. pylori* RNA-gepulste DCs

Der zeitliche Versuchsablauf gestaltete sich wie folgt: Die Immunisierung mit gepulsten DCs wurde insgesamt zweimal intraperitoneal mit jeweils einer Injektion pro Woche verabreicht. Die Kontrollgruppe (1) stellte die nicht-infizierte und nicht-behandelte Kontrolle dar, Gruppe (2) wurde ebenfalls nicht infiziert erhielt aber eine Injektion mit ungepulsten DCs und Gruppe (3) wurde als Infektionskontrolle mit *H. pylori* infiziert. Die Immunisierung der Gerbils erfolgte einerseits mit Lysat-gepulsten DCs (4), andererseits mit RNA-gepulsten DCs (5). Die Verabreichung der DCs fand vor der Infektion mit *H. pylori* statt. Das Experiment wurde nach vier Wochen Infektionsdauer beendet. Die Versuche wurden zwei Mal zu unterschiedlichen Zeitpunkten und voneinander unabhängig durchgeführt.

### **5.3.3.1 Einfluss der Immunisierung mit DCs auf die *H. pylori*-induzierte Bildung spezifischer Antikörper**



**Abbildung 42: Einfluss der Immunisierung mit DCs auf die *H. pylori*-induzierte Bildung spezifischer Antikörper**

In der unbehandelten Kontrollgruppe (1) und der nicht-infizierten Gruppe (2), die eine Injektion mit ungeladenen DCs erhielt, zeigte sich keine signifikant erhöhte Bildung *H. pylori*-spezifischer Antikörper. Durch eine Infektion konnte in allen infizierten Gruppen (3, 4, 5) eine signifikante Steigerung von Immunglobulin G nachgewiesen werden. Nur die Injektion von Lysat-geladenen DCs (4) führte zu einem signifikanten Anstieg der Antikörpertiter gegenüber infizierten Gerbils, die eine Injektion mit ungeladenen DCs erhielten (3), nicht jedoch die Verabreichung von RNA-geladenen DCs (5).

\* = nicht-infiziert (1) vs. infiziert (3, 4, 5); + = infiziert/nicht-geladene (3) vs. infiziert/geladene DCs (4, 5);  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=6$

Der Einfluss einer Infektion mit *H. pylori* und der vorhergehenden Immunisierung mit DCs auf den *H. pylori*-spezifischen Antikörpertiter ist in Abbildung 42 gezeigt. In der nicht-infizierten Kontrollgruppe, die nur eine Injektion mit PBS (1) und in der nicht-infizierten Gruppe, die eine Kontrollinjektion mit ungeladenen DCs erhielt (2), zeigte sich keine erhöhte Produktion von *H. pylori*-spezifischem Immunglobulin G. Im Vergleich dazu konnten in allen infizierten Gerbils (3, 4, 5) signifikant erhöhte Antikörpertiter gegen *H. pylori* beobachtet werden. Durch die Verabreichung von Lysat-geladenen DCs wurde in infizierten Gerbils (4) ein signifikanter Anstieg der Antikörperproduktion gegenüber den Tieren festgestellt, die zwar ebenfalls eine

Infektion mit *H. pylori*, aber nur eine Injektion mit ungepulsten DCs erhielten (3). Die Injektion von RNA-gepulsten DCs führte im Gegensatz dazu nicht zu einer Erhöhung. Durch eine Infektion mit *H. pylori* kam es also zu einer verstärkten Produktion von gegen das Bakterium gerichtetem Immunglobulin G, die durch die Verabreichung von Lysat-gepulsten DCs gesteigert werden konnte.

### 5.3.3.2 PCR-Nachweis von *H. pylori* im Magengewebe

Der Nachweis von *H. pylori*-DNA im Magengewebe erfolgte durch die Amplifizierung eines charakteristischen Bereichs des bakteriellen Urease-Gens. Mithilfe dieser Methode konnte die Infektionseffizienz überprüft werden, eine quantitative Bestimmung der Bakterienlast war aber aufgrund der fehlenden Normalisierung mit einem konstitutiv exprimierten Gen nicht möglich.

	BB + PB i.p. (1)	BB + DCs i.p. (2)	Infektion Hp + DCs i.p. (3)	Infektion Hp + DCs Lysat i.p. (4)	Infektion Hp + DCs RNA i.p. (5)
Gesamtanzahl Gerbils	6	6	6	6	6
DNA-Nachweis positiv	0	0	6	6	5
DNA-Nachweis negativ	6	6	0	0	1

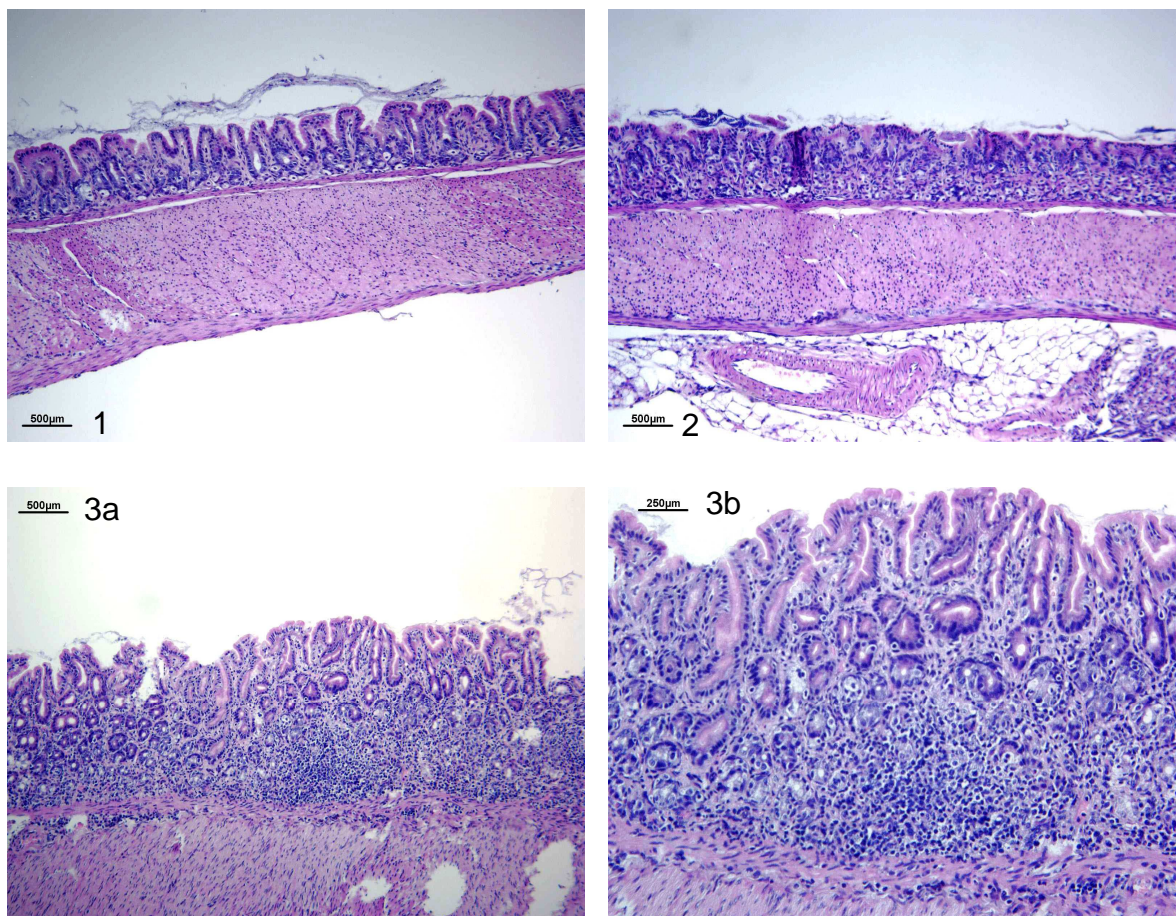
**Tabelle 11: PCR-Nachweis von *H. pylori*-DNA im Magengewebe**

Der PCR-Nachweis von *H. pylori*-DNA im Magengewebe erfolgte durch die Amplifizierung eines charakteristischen Bereichs des Urease-Gens. Eine quantitative Bestimmung der Bakterienlast war mit dieser Methode nicht möglich, es handelte sich lediglich um eine Kontrolle der Infektionseffizienz. In allen nicht-infizierten Gerbils konnte keine *H. pylori*-DNA im Magengewebe amplifiziert werden. Bei den infizierten Tieren gab es einen Einzelfall, in dem es nicht zu einer erfolgreichen Kolonisierung des Magens durch *H. pylori* gekommen ist.

Wie in Tabelle 11 gezeigt, konnte in allen zwölf nicht-infizierten Kontrolltieren keine *H. pylori*-DNA im Magengewebe festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte bei den 18 infizierten Tieren lediglich in einer Maus keine erfolgreiche

Kolonisierung des Magens durch *H. pylori* nachgewiesen werden. Die durchgeführten Infektionen führten also bis auf ein Tier zu einer erfolgreichen Kolonisierung des Gerbil-Magens.

### 5.3.3.3 Einfluss der Immunisierung mit DCs auf *H. pylori*-induzierte Entzündungserscheinungen im Magen



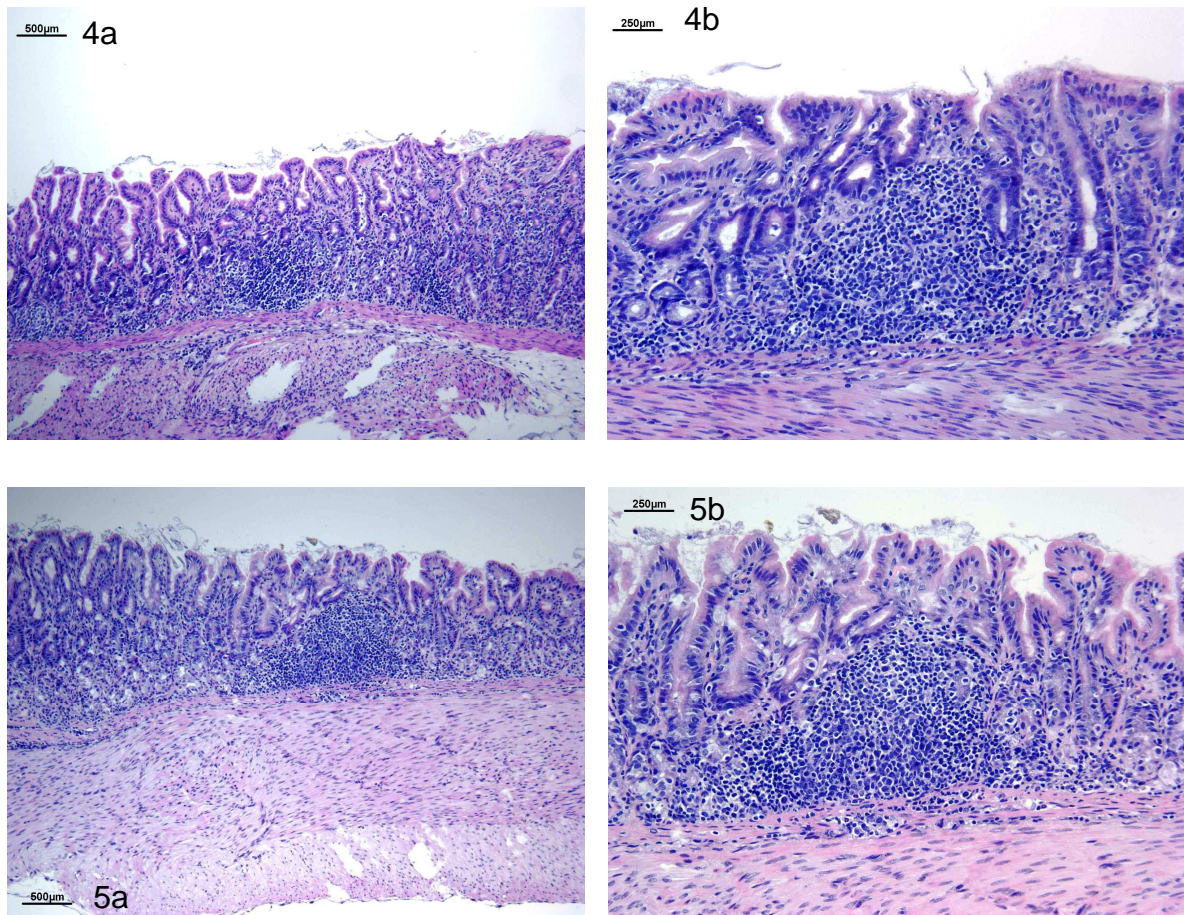
**Abbildung 43: Einfluss der Immunisierung mit DCs auf *H. pylori*-induzierte Entzündungserscheinungen im Magen (HE-Färbung)**

Gruppe (1): BB + PBS i.p. => Antrum, 100fache Vergrößerung

Gruppe (2): BB + DCs i.p. => Antrum, 100fache Vergrößerung

Gruppe (3): Infektion Hp + DCs i.p. => 3a: Antrum, 100fache Vergrößerung; 3b: Lymphfollikel, 200fache Vergrößerung





Gruppe (4): Infektion Hp + DCs Lysat i.p. => 4a: Antrum, 100fache Vergrößerung; 4b: Lymphfollikel, 200fache Vergrößerung

Gruppe (5): Infektion Hp + DCs RNA i.p. => 5a: Antrum, 100fache Vergrößerung; 5b: Lymphfollikel, 200fache Vergrößerung

In den nicht-infizierten Kontrollen (1, 2) konnten keine histopathologischen Veränderungen der Magenschleimhaut beobachtet werden. Alle mit *H. pylori* infizierten Gerbils (2, 3, 4, 5) zeigten eine ausgeprägte Infiltration von Entzündungszellen. Diese war jedoch auf die Lamina beschränkt und reichte nicht in die Tiefe des Bindegewebes. Auch Gewebedysplasie und Lymphfollikel konnten in allen infizierten Gerbils nachgewiesen werden. Die Ausprägung der histopathologischen Veränderungen war unabhängig von einer Injektion mit Lysat- oder RNA-gepulsten DCs.

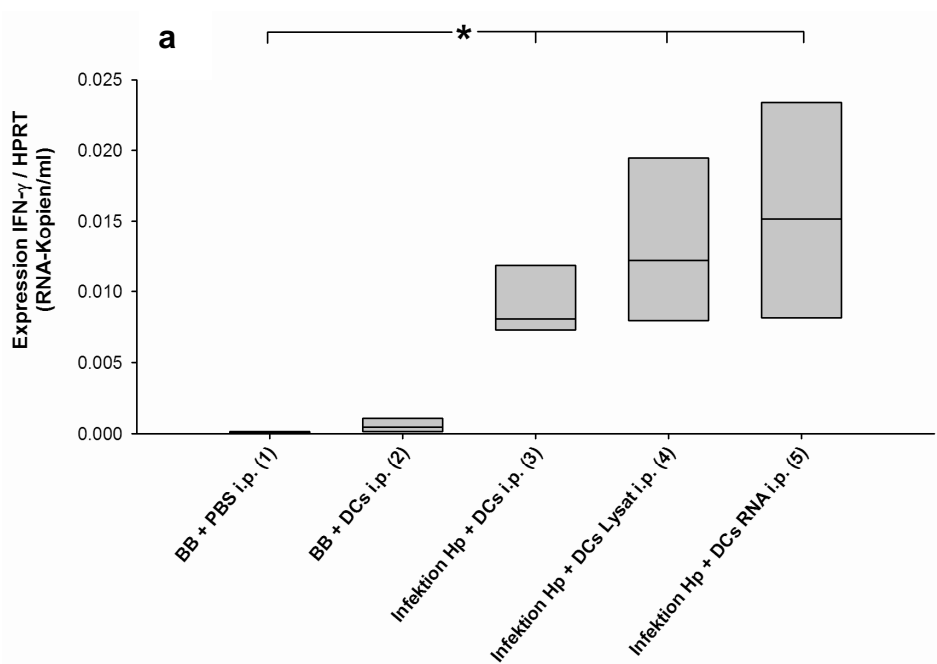
Der Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlich gepulsten DCs auf *H. pylori*-induzierte Entzündungserscheinungen in der Magenschleimhaut ist in Abbildung 43 gezeigt. Bei allen nicht-infizierten Tieren (1, 2) waren keine histopathologischen Veränderungen sichtbar. Mit *H. pylori* infizierte Gerbils (3, 4, 5) wiesen neben einer ausgeprägten Infiltration von Entzündungszellen auch Gewebedysplasie und Lymphfollikel auf. Die Infiltration der Entzündungszellen beschränkte sich dabei



auf die Lamina und reichte nicht bis in die Tiefe des Bindegewebes der *Tela submucosa*. Die Injektion von Lysat- oder RNA-gepulsten DCs hatte auf die Ausprägung der histopathologischen Veränderungen keinen Einfluss.

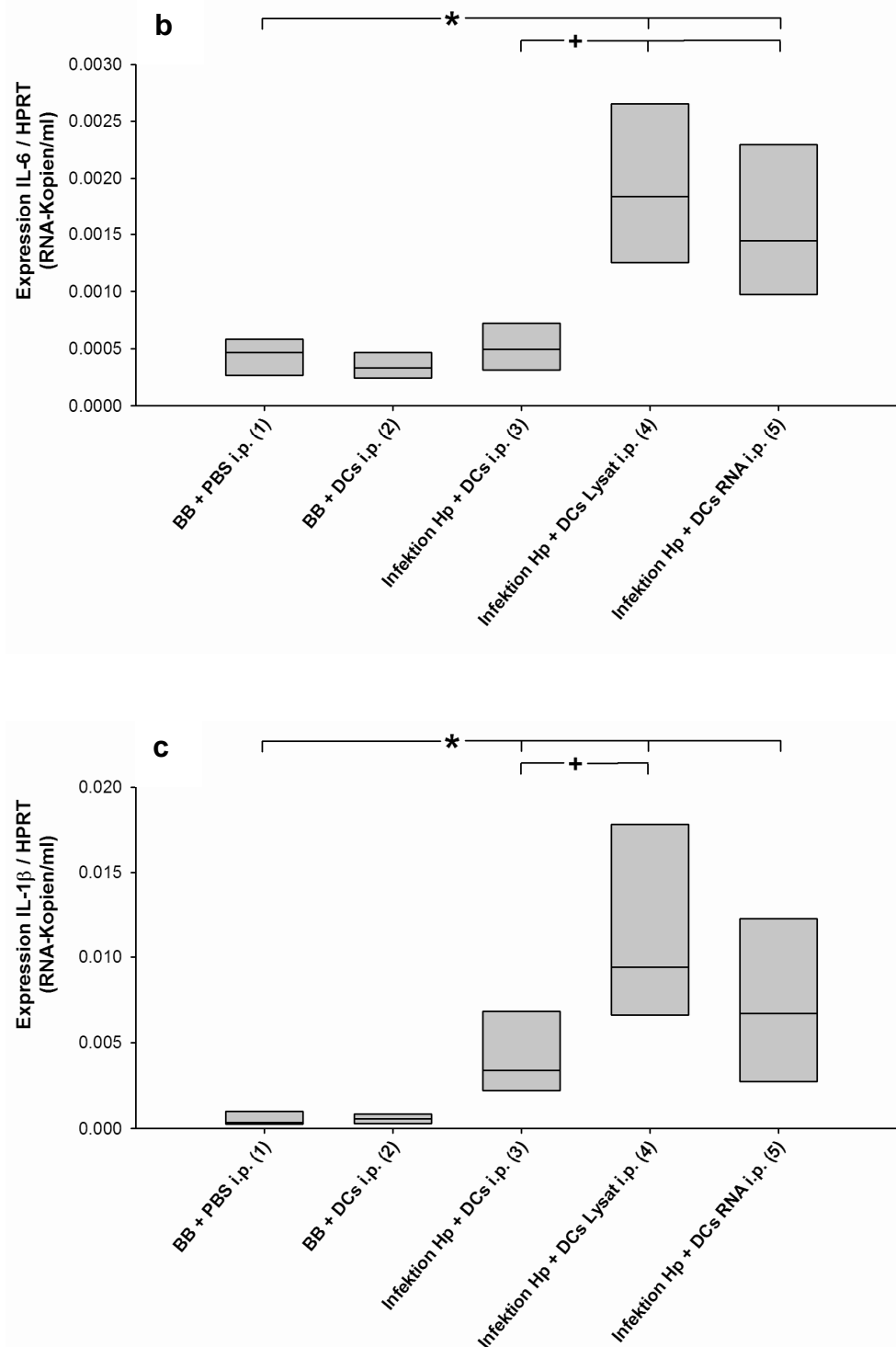
### 5.3.3.4 Einfluss der Immunisierung mit DCs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression im Magengewebe

#### 5.3.3.4.1 Proinflammatorische Zytokine



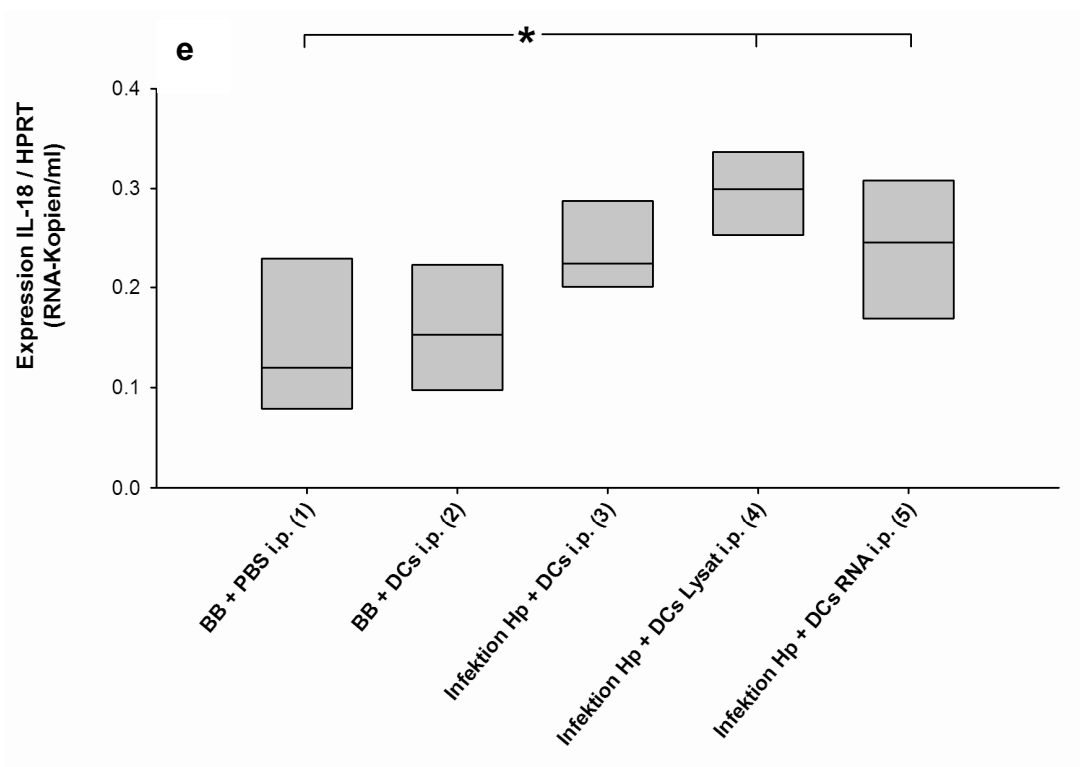
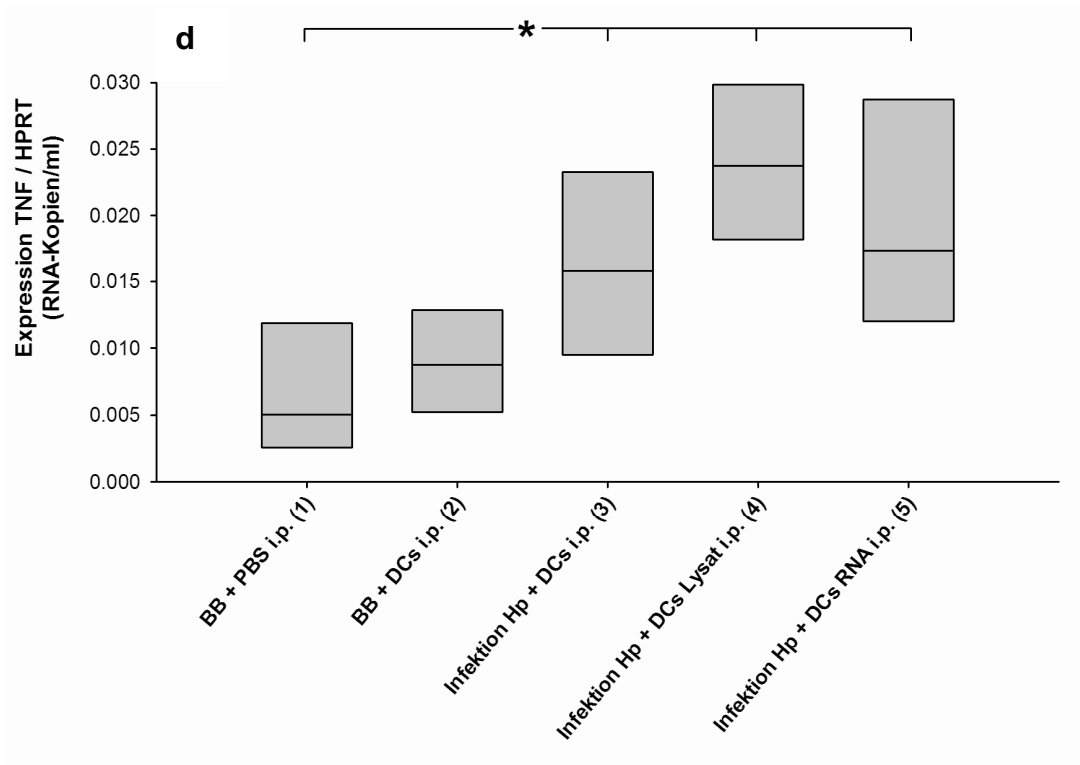
**Abbildung 44: Einfluss der Immunisierung mit DCs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Magengewebe**

44 a) + d) Die Infektion mit *H. pylori* (3, 4, 5) führte im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen (1, 2) zu einer statistisch signifikant erhöhten RNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF.

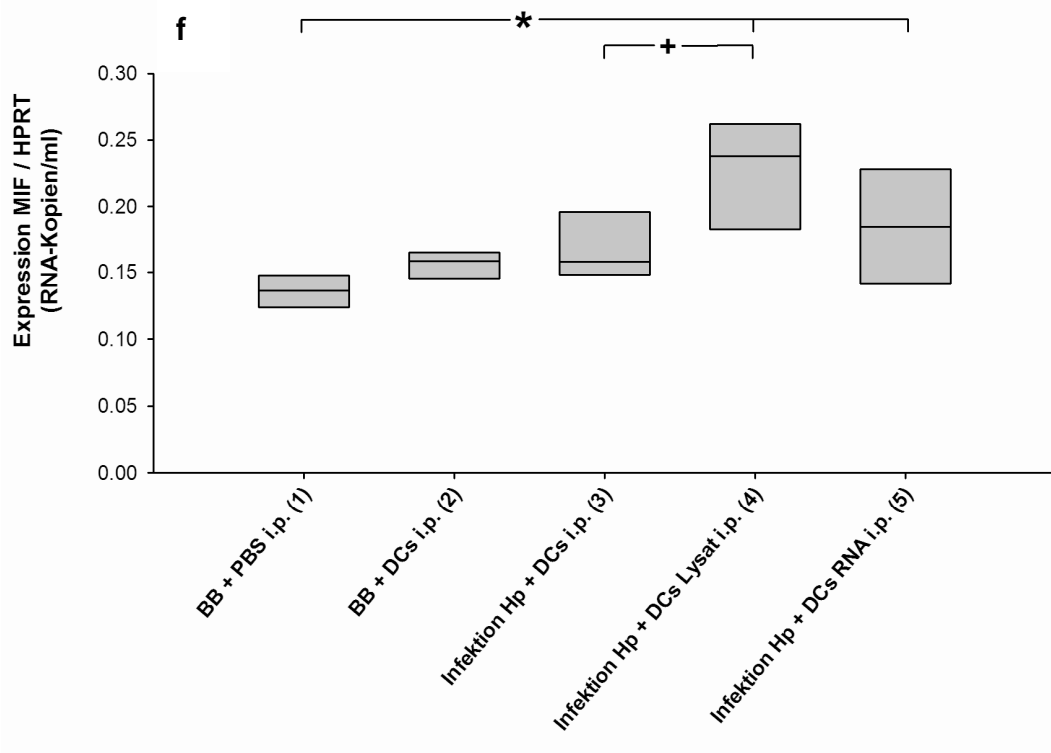


44 b) Durch die Injektion von Lysat- oder RNA-gepulsten DCs (4, 5) konnte die Expression von IL-6-RNA stark gesteigert werden.

44 c) IL-1 $\beta$ -RNA wurde im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollgruppen (1, 2) statistisch signifikant in allen mit *H. pylori* infizierten Gerbils (3, 4, 5) exprimiert, die Verabreichung von Lysat-gepulsten DCs führte gegenüber der Infektions- und DC-Kontrolle (3) zu einer gesteigerten RNA-Expression.



44 e) Durch die Injektion von Lysat- oder RNA-gepulsten DCs (4, 5) konnte gegenüber der Kontrollgruppe (1) eine erhöhte RNA-Expression von IL-18 beobachtet werden.



44 f) Im Vergleich zur Kontrollgruppe (1) konnte durch die Injektion von Lysat- oder RNA-gepulsten DCs (4, 5) eine gesteigerte Expression von MIF-RNA beobachtet werden, wobei es bei der Verabreichung von Lysat-gepulsten DCs zu einer gegenüber der Infektions- und DC-Gruppe (3) statistisch signifikant gesteigerten RNA-Expression kam.

\* = nicht-infiziert (1) vs. infiziert (3, 4, 5); + = infiziert/nicht-immunisiert (3) vs. infiziert/immunisiert (4, 5);  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=6$

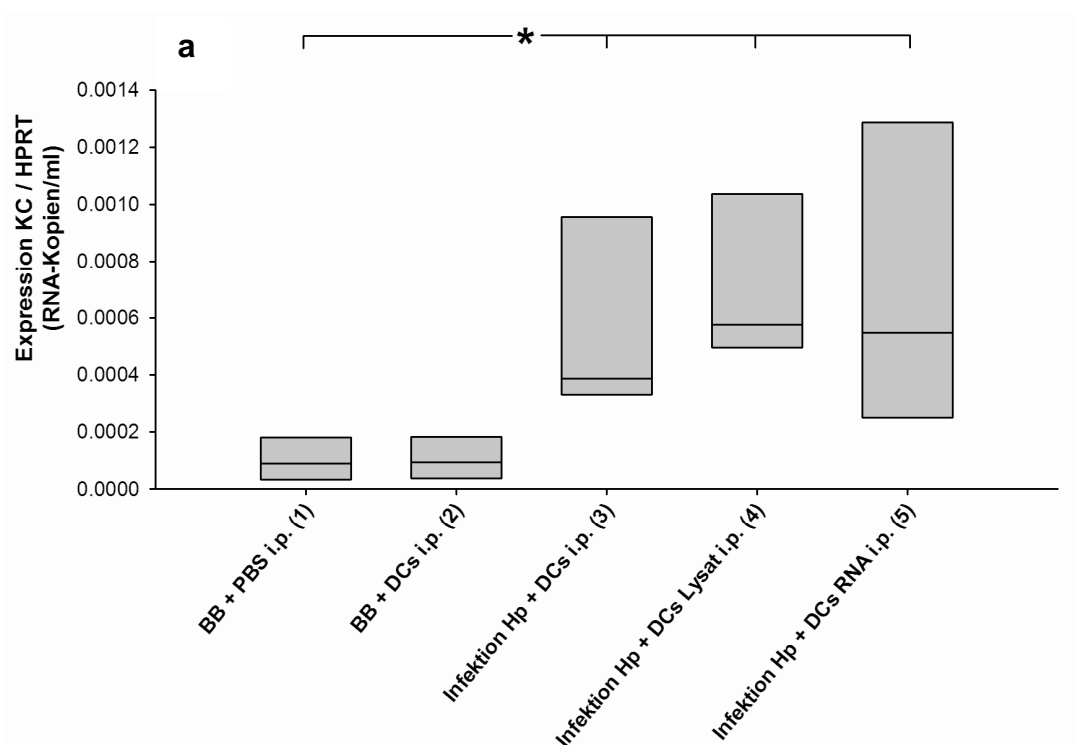
Wie in den Abbildung 44 a) und 44 d) gezeigt, war die im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) erhöhte RNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF auf eine Infektion mit *H. pylori* zurückzuführen (3, 4, 5). Durch die Verabreichung von Lysat-gepulsten DCs kam es für IL-1 $\beta$ , wie in Abbildung 44 c) dargestellt, gegenüber der Infektions- und DC-Kontrollgruppe (3) zu einer gesteigerten Expression. In Abbildung 44 b) ist dargestellt, wie es nach der Injektion von Lysat- oder RNA-gepulsten DCs (4, 5) zu einer verstärkten Expression von IL-6-RNA kam. Wie in den Abbildungen 44 e) und f) dargestellt, führte die Injektion von Lysat- oder RNA-gepulsten DCs (4, 5) zu einer erhöhten RNA-Expression von IL-18 und MIF. Durch die Verabreichung von Lysat-gepulsten DCs kam es bei MIF, wie in Abbildung 44 f) gezeigt, zu einer gegenüber der Infektionskontrolle (3) gesteigerten RNA-Expression. Zum Zeitpunkt vier Wochen nach Infektion der Gerbils mit *H. pylori* konnte im Vergleich zu den

Kontrollen (1, 2) in keiner der Versuchsgruppen (3, 4, 5) eine statistisch signifikant veränderte RNA-Expression von IL-12 p35 oder p40 beobachtet werden (siehe Tabelle 12).

#### 5.3.3.4.2 Antiinflammatorische Zytokine

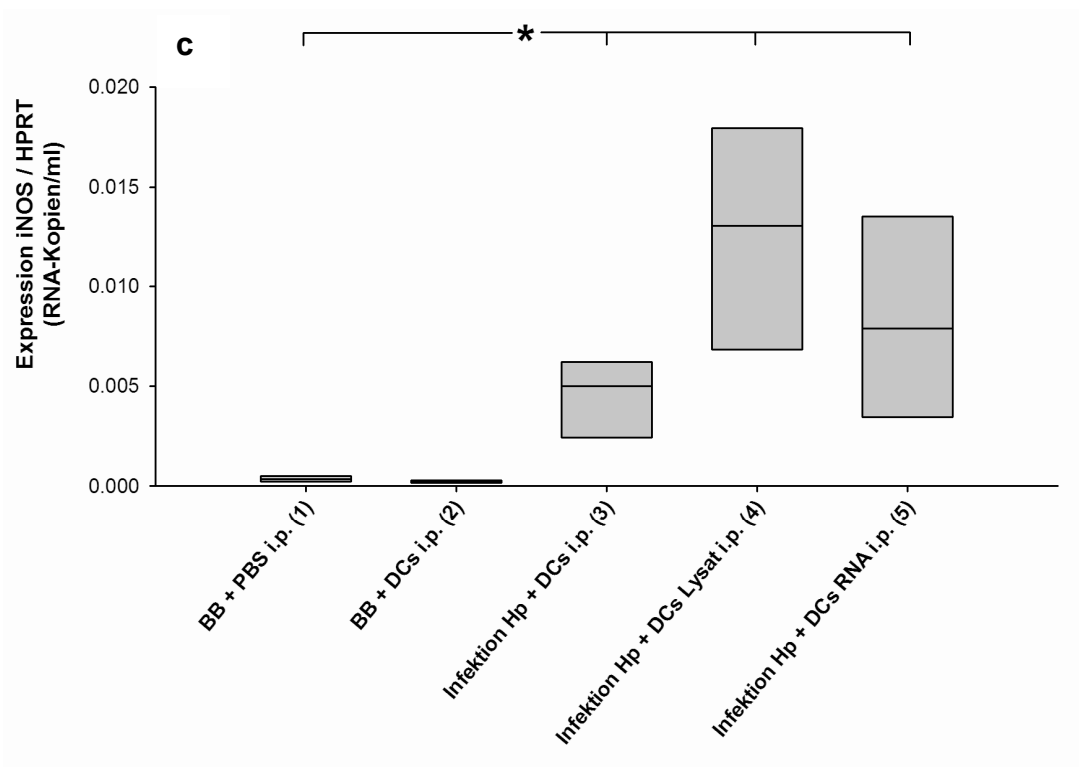
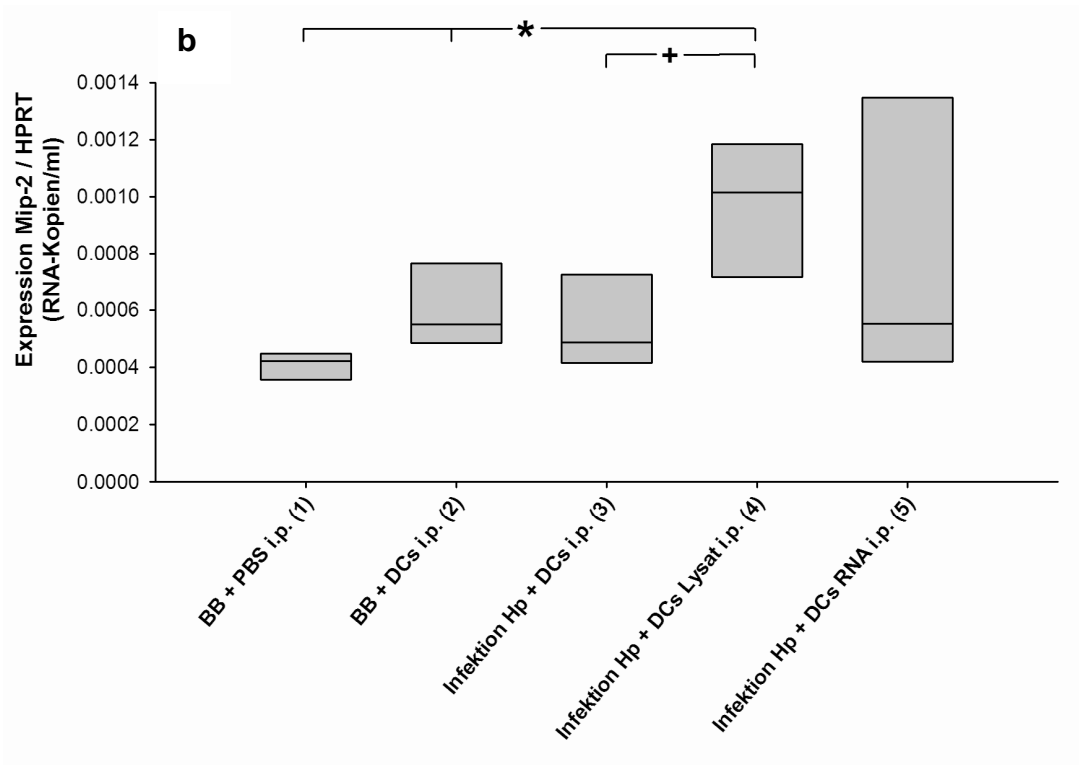
In diesem Versuchsansatz kam es vier Wochen nach Infektion der Gerbils mit *H. pylori* gegenüber den Kontrollgruppen (1, 2) in allen behandelten und infizierten Gerbils (3, 4, 5) zu keiner statistisch signifikant erhöhten RNA-Expression von IL-4 oder IL-10 (siehe Tabelle 12).

#### 5.3.3.4.3 Chemokine und iNOS



**Abbildung 45: Einfluss der Immunisierung mit DCs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von Chemokinen und iNOS im Magengewebe**

45 a) + c) Im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) konnte in allen mit *H. pylori* infizierten Versuchsgruppen (3, 4, 5) eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression von KC und iNOS beobachtet werden.

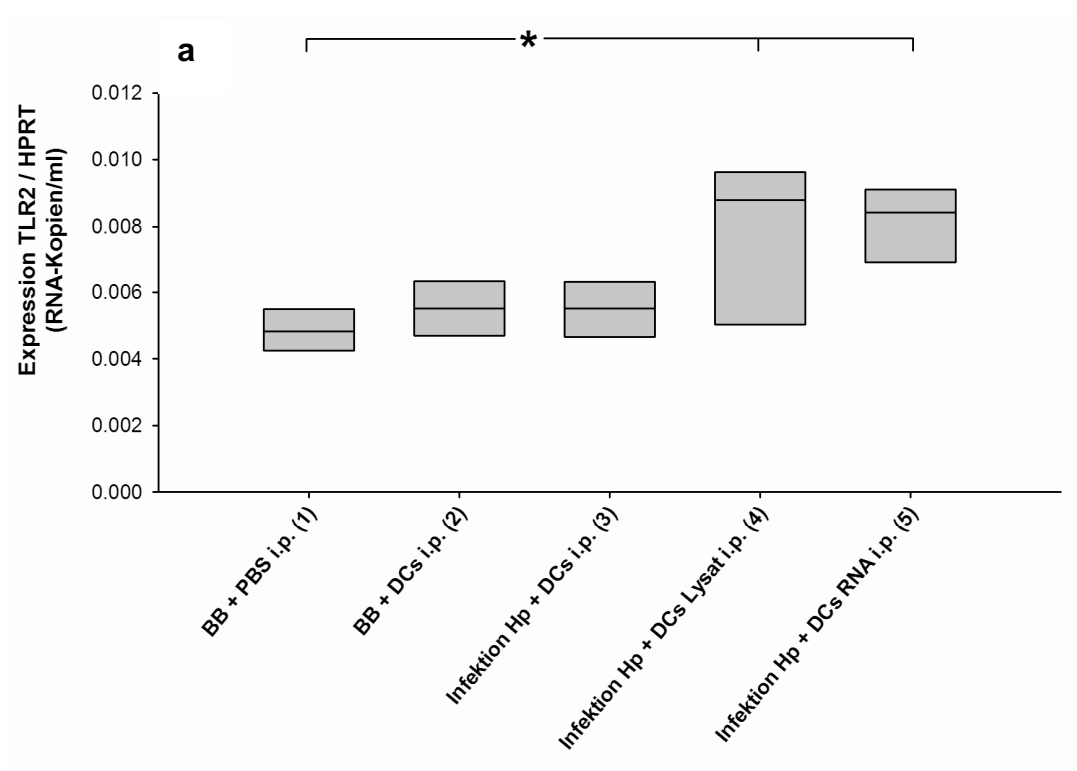


45 b) Die Injektion von Lysat-gepulsten DCs (4) führte gegenüber der Infektions- und DC-Kontrolle (3) zu einer leicht gesteigerten RNA-Expression von Mip-2.

\* = nicht-infiziert (1) vs. infiziert (3, 4, 5); + = infiziert/nicht-immunisiert (3) vs. infiziert/immunisiert (4, 5);  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=6$

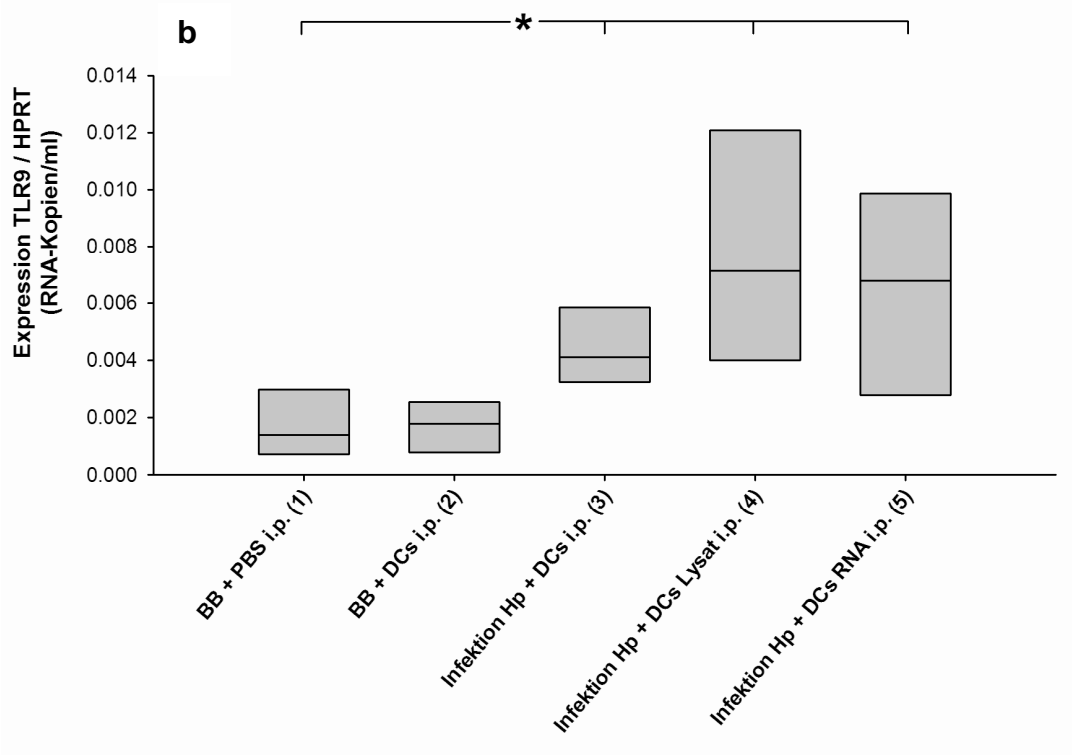
Wie in den Abbildung 45 a) und c) gezeigt, konnte eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression von KC und iNOS im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) in allen mit *H. pylori* infizierten Gerbils (4, 5) nachgewiesen werden. Bei Mip-2 führte die Injektion von Lysat-gepulsten DCs (4), wie in Abbildung 45 b) gezeigt, zu einer leicht gesteigerten RNA-Expression gegenüber der Infektions- und DC-Kontrolle (3).

#### 5.3.3.4.4 Toll-like Rezeptoren



**Abbildung 46: Einfluss der Immunisierung mit DCs auf die *H. pylori*-induzierte RNA-Expression von TLRs im Magengewebe**

46 a) Die Injektion von gepulsten DCs führte bei infizierten Gerbils (4, 5) zu einer gegenüber der nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) erhöhten Expression von TLR2.



46 b) Im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (1) konnte in allen mit *H. pylori* infizierten Versuchsgruppen (3, 4, 5) eine statistisch signifikant erhöhte RNA-Expression von TLR9 beobachtet werden.

\* = nicht-infiziert (1) vs. infiziert (3, 4, 5); + = infiziert/nicht-immunisiert (3) vs. infiziert/immunisiert (4, 5);  $p < 0,05$  nach Analyse mit Mann-Whitney-U-Test;  $n=6$

In Abbildung 46 a) ist die RNA-Expression von TLR 2 gezeigt. Durch die Injektion von gepulsten DCs konnte bei infizierten Gerbils (4, 5) eine gegenüber der nicht-infizierten Kontrollgruppe (1) erhöhte Expression nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen (1, 2) konnte zum Zeitpunkt vier Wochen nach der Infektion keine gesteigerte RNA-Expression von TLR4 und TLR5 festgestellt werden (siehe Tabelle 12). TLR9-RNA wurde, wie in Abbildung 46 b) gezeigt, in allen mit *H. pylori* infizierten Versuchsgruppen (3, 4, 5) gegenüber der nicht-infizierten Kontrolle (1) signifikant verstärkt exprimiert.



### 5.3.3.4.5 Übersicht und Zusammenfassung: RNA-Expressionsprofil des Magens

	BB + PBS i.p. (1)	BB + DCs i.p. (2)	Infektion Hp + DCs i.p. (3)	Infektion Hp + DCs Lysat i.p. (4)	Infektion Hp + DCs RNA i.p. (5)
<b>Proinflammatorische Zytokine</b>					
IFN- $\gamma$	-	-	*	*	*
IL-6	-	-	-	* +	* +
IL-1 $\beta$	-	-	*	* +	*
TNF	-	-	*	*	*
IL-12p35	-	-	-	-	-
IL-12p40	-	-	-	-	-
IL-18	-	-	-	*	*
MIF	-	-	-	* +	*
<b>Antiinflammatorische Zytokine</b>					
IL-4	-	-	-	-	-
IL-10	-	-	-	-	-
<b>Chemokine</b>					
KC	-	-	*	*	*
Mip-2	-	*	-	* +	-
iNOS	-	-	*	*	*
<b>Toll-like Rezeptoren</b>					
TLR2	-	-	-	*	*
TLR4	-	-	-	-	-
TLR5	-	-	-	-	-
TLR9	-	-	*	*	*

**Tabelle 12: Übersicht RNA-Expressionsprofil des Magens**

Übersicht über die Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, iNOS, Chemokinen und TLRs im Magengewebe.

- = Expression nicht signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1)

\* = Expression signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe (1)

+ = Expression signifikant erhöht im Vergleich zur Infektionskontrolle (3)

Wie in Tabelle 12 gezeigt, konnte in allen infizierten Gerbils eine erhöhte Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und TNF im Magen beobachtet werden. Durch die Injektion von gepulsten DCs wurde die RNA-Expression von IL-6, IL-18 und MIF gegenüber der nicht-infizierten Kontrollgruppe stark gesteigert. Eine gegenüber den Kontrollgruppen verstärkte Expression von IL-12 (p35 und p40 Untereinheit) konnte nicht beobachtet werden, ebenso wie die für eine Th2-Immunantwort wichtigen, antiinflammatorisch wirksamen Zytokine IL-4 und IL-10. Eine Infektion mit *H. pylori* führte zu einer erhöhten RNA-Expression von KC und iNOS. Das Chemokin Mip-2 zeigte nach der Injektion von Lysat-gepulsten DCs eine gesteigerte RNA-Expression gegenüber der Infektionskontrolle. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen konnte keine verstärkte Expression von TLR4 und TLR5 nachgewiesen werden. TLR2-RNA wurde nach Injektion von gepulsten DCs verstärkt exprimiert, während TLR9 in allen mit *H. pylori* infizierten Gerbils eine gesteigerte RNA-Expression aufwies.

Die Infektion mit *H. pylori* führte also zu einer verstärkten Expression von proinflammatorisch wirksamen Proteinen. Gegenüber dieser konnte durch den Einsatz von Lysat-gepulsten DCs im Vergleich zu RNA-gepulsten DCs eine gesteigerte RNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Magen-gewebe beobachtet werden.

## 6 Diskussion

### 6.1 Das Gerbil-Tiermodell der *H. pylori*-Infektion

Eine Infektion mit *H. pylori* führt zu einer starken proinflammatorischen Reaktion des Immunsystems, die aber nicht in der Lage ist, das Bakterium effektiv zu eradizieren. Um die hinter diesem Vorgang stehenden immunologischen Prozesse untersuchen zu können, ist ein geeignetes Tiermodell notwendig. Experimentelle Infektionen wurden zwar bereits mit vielen Tierarten durchgeführt, aber entweder waren hohe Kosten hinderlich oder es kam im Vergleich zum Menschen zu unterschiedlich ausgeprägten histopathologischen Veränderungen in Magen und Duodenum (Radin et al., 1990; Eaton et al., 1991; Dubois et al., 1994; Eaton et al., 1994; Handt et al., 1995; Fox et al., 1995; Eaton et al., 1996). Mäuse haben sich als Standard-Labortiere etabliert und sind durch ihre kostengünstige Haltung und die große Verfügbarkeit immunologischer Reagenzien ein ideales Tiermodell. Allerdings kommt es bei Ihnen oftmals zu keiner Kolonisierung des Magens durch *H. pylori*. Deshalb wurde eine Infektion mit *H. felis* etabliert (Nedrud et al., 2001; Takaishi et al., 2007; Bergin et al., 2008; Waghray et al., 2010).

Dieses Bakterium ist natürlicherweise in der Lage, den Mausmagen zu kolonisieren. Die dadurch ausgelösten pathologischen Veränderungen im Magen entsprechen allerdings nur zu einem Teil den im Menschen beobachteten (Ferrero et al., 2000). Außerdem ist für eine Untersuchung von Pathogenitätsfaktoren die Verwendung von *H. pylori* notwendig, da sich die einzelnen Stämme hierbei zum Teil deutlich voneinander unterscheiden, z.B. fehlen *H. felis* im Gegensatz zu *H. pylori* wichtige Gene bzw. sind inaktiv.

1991 wurde eine Infektion mit *H. pylori* erstmals erfolgreich mit Gerbils, der Mongolischen Wüstenrennmaus oder *Meriones unguiculatus*, durchgeführt (Yokota et al., 1991). *H. pylori* ist in der Lage, den Magen dieser Tiere zu kolonisieren und es kommt im Vergleich zum Menschen zu ähnlichen histopathologischen Veränderungen. Eine Infektion von Gerbils mit *H. pylori* resultiert in einer Gastritis, die zuerst im Antrum sichtbar wird und sich nach einiger Zeit in den Korpus ausdehnt (Ikeno et al., 1999). Die Bildung von Ulcera

konnte sowohl im Magen als auch im Duodenum beobachtet werden, ebenso die Ausbildung von intestinaler Metaplasie und Adenokarzinomen (Honda et al., 1998b; Honda et al., 1998a; Ikeno et al., 1999; Ogura et al., 2000; Ohkusa et al., 2003; Watanabe et al., 1998). Auch die Untersuchung der Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* wurde mit diesem Tiermodell bereits erfolgreich durchgeführt. So konnten Stämme mit einer funktionellen Cag-Pathogenitätsinsel (PAI) deutlich mehr histologische Schäden hervorrufen als Cag-negative Stämme (Ogura et al., 2000; Israel et al., 2001; Akanuma et al., 2002). Ein weiterer Vorteil von Gerbils sind die gegenüber Mäusen nur unwesentlich erhöhten Anschaffungs- und Unterhaltskosten.

Aber auch dieses Tiermodell unterliegt einigen Einschränkungen. So kann nicht jeder *H. pylori*-Stamm den Gerbil-Magen gleich gut kolonisieren. Das erfordert entweder eine spezielle Auswahl der verwendeten Bakterien-Stämme oder eine Adaption der menschlichen Isolate an den Gerbil. Dazu werden die Tiere mit *H. pylori* infiziert und das Bakterium nach einigen Wochen wieder aus dem Magen reisoliert. Der dabei erhaltene *Helicobacter* ist dann normalerweise in der Lage, sofort den Magen von Gerbils zu kolonisieren. In Einzelfällen gibt es mittlerweile auch kritische Stimmen, die die generelle Tauglichkeit von Gerbils als Infektionsmodell anzweifeln (Otaka et al., 2006). In dieser Arbeit wurde aber beispielsweise nur ein einzelnes Hitzeschock-Protein als immunologischer Parameter betrachtet, was natürlich keine komplexen Aussagen über den Ablauf der Infektion mit *H. pylori* erlaubt.

Auch das Geschlecht der verwendeten Gerbils spielt wie bei Mäusen eine wichtige Rolle. Männliche und weibliche C57/BL6 Mäuse unterscheiden sich in ihren Reaktionen auf eine Infektion mit *H. pylori*. Bei Weibchen kommt es während einer Langzeit-Infektion mit *H. pylori* zu verstärkten histopathologischen und apoptotischen Veränderungen im Magengewebe, ebenso zu einer gesteigerten epithelialen Proliferation (Court et al., 2003). Bei der Ausbildung von Magenkrebs konnte nach einer Infektion von C57BL/6 mit *H. felis* nach 13-15 Monaten jedoch kein geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt werden (Fox et al., 2003). Interessanterweise wurde bei weiblichen Mäusen durch eine vermehrte Produktion von IL-12 und IFN- $\gamma$  eine gesteigerte Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen im Vergleich zu Männchen festgestellt (Kim et al., 1999). Die erhöhte Proteinkonzentration von IL-12 könnte durch eine Östrogen-bedingte Aktivierung

von STAT4, einem zellulären Transkriptionsfaktor, ausgelöst worden sein (Fox et al., 2003). Da IL-12 eine wichtige Rolle bei der *H. pylori*-Infektion spielt, wäre dies eine Erklärung für die unterschiedliche Suszeptibilität der Geschlechter (Court et al., 2003). Bei den verwendeten Mäusen handelte es sich jedoch um Inzuchtstämme, während Gerbils als Auszucht-Tiere gezüchtet werden. Dadurch erhöht sich die genetische Variabilität der einzelnen Tiere. Die beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede wurden allerdings auch im Gerbil nachgewiesen. Nach einer vierwöchigen Infektion mit *H. pylori* konnte in weiblichen Gerbils eine erhöhte Expression von IFN- $\gamma$  und IL-12p40 in der Magenschleimhaut beobachtet werden. Bei Männchen war die Produktion deutlich geringer, während epitheliale Proliferation und apoptotische Veränderungen vergleichbar ausgebildet waren (Crabtree et al., 2004). Da das Th1-geprägte Zytokinprofil weiblicher Gerbils dem menschlichen Infektionsablauf mit *H. pylori* am besten entspricht, wurden, wie in anderen wissenschaftlichen Untersuchungen ebenso üblich (Rieder et al., 2007; Hildebrandt et al., 2009), auch für diese Arbeit nur weibliche Tiere verwendet.

Ein großer Nachteil bei der Verwendung von Gerbils ist, dass kommerzielle Reagenzien nur vereinzelt erhältlich und keine transgenen Tiere verfügbar sind. Da diese Faktoren wichtige Werkzeuge zur Analyse einer Reaktion des Immunsystems darstellen, mussten in dieser Arbeit alternative Methoden entwickelt werden, wie z.B. selbst entwickelte PCR-Verfahren.

Trotz der genannten Nachteile haben sich Gerbils aufgrund der im Vergleich zum Menschen sehr ähnlichen histopathologischen Veränderungen im gastro-duodenalen Bereich mittlerweile als geeignetes Standard-Modellsystem für die *in vivo* Untersuchung der *H. pylori* Infektion etabliert (Chi et al., 1999; Nozaki et al., 2005; Kato et al., 2010; Martin et al., 2010; Hur et al., 2011).

## **6.2 Klonierung von Gerbil-Genen und Etablierung einer immunologischen Analyseverfahren durch quantitative PCR**

Um die durch *H. pylori* ausgelöste Immunantwort im Gerbil analysieren zu können, wurde die Etablierung eines zuverlässigen Verfahrens erforderlich, welches am besten direkt am Ort des Geschehens anwendbar sein sollte, also im

Magengewebe. Für diese Art der Untersuchungen bietet sich die quantitative PCR an. Es wurde ein TaqMan® System für Gerbils etabliert, von dem sich im späteren Verlauf herausstellte, dass es nicht nur für die Untersuchung von Magengewebe geeignet ist. Auch die Analyse des Expressionsprofils von primären Zellkulturen, wie z.B. Splenozyten oder Dendritischen Zellen, ist mithilfe dieser Methode möglich.

Grundvoraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist eine bekannte DNA-Sequenz. Vereinzelte Gerbil-Gensequenzen waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit bereits im Datenbanksystem GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) veröffentlicht. Die vorhandene Datenlage reichte jedoch für eine umfassende Analyse nicht aus.

Für einige wenige Parameter (z.B. IFN- $\gamma$ ) konnte anhand bereits veröffentlichter DNA-Sequenzinformationen direkt ein Primer-Pärchen an den kodierenden Bereich angesetzt werden. Hierbei kam es immer zur Amplifikation eines PCR-Produkts, welches nach einer Reamplifikation und Aufreinigung für die quantitative PCR verwendet werden konnte. In einigen Fällen konnten für einzelne Basen Abweichungen von den veröffentlichten Sequenzen festgestellt werden. Im Gegensatz zu Mäusen, die meist von Kolonien mit Inzucht-Stämmen abstammen, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Gerbils als Auszucht-Tiere gezüchtet. Dadurch kommt es zur genetischen Variabilität zwischen einzelnen Tieren und auch zwischen Gerbil-Stämmen.

Ein Großteil der bisher unbekannten Sequenzen konnte mit der Methode der sogenannten „Cross-species-PCR“ erhalten werden (Mai et al., 1994). Dazu wurde ein Sequenzvergleich zwischen Maus-, Ratte- und Humangenomen durchgeführt und in diesen nach homologen Bereichen gesucht. *Mus musculus* (Hausmaus) hat sich hierbei als nützlichste Informationsquelle erwiesen, da das komplette Genom zu diesem Zeitpunkt bereits sequenziert und der Grad der Homologie zwischen Gerbil und Maus für eine Amplifizierung ausreichend war. In Bereichen mit größtmöglicher Übereinstimmung wurde dann ein Primer-Pärchen angesetzt und in den meisten Fällen konnte auf diese Art und Weise ein PCR-Produkt amplifiziert werden. Um eventuelle Primer Fehlpaarungen ignorieren zu können, wurde die Schmelztemperatur während der PCR zum Teil sehr stark herabgesetzt.

Bisweilen führte diese Methode jedoch auch nicht zum Erfolg bzw. das erhaltene DNA-Stück war zu kurz. In diesen Fällen konnten durch den Einsatz einer RACE-PCR ausreichend lange DNA-(Teil-)Abschnitte amplifiziert werden (Gaucher et al., 2001). Kernstück dieser Methode ist ein (dT)<sub>17</sub>-Adaptorprimer, der sehr gut an den Poly-A-Schwanz der verwendeten RNA bindet. In allen untersuchten Genen konnte mithilfe eines durchgeführten Homologieabgleichs ein passendes Teilstück von ca. 20 Basen gefunden werden. In diesem Bereich wurde dann ein für die RACE-PCR notwendiger sequenzspezifischer Primer angesetzt.

Das erhaltene Gerbil-Gen wurde in einen Vektor subkloniert und anschließend sequenziert. Mit dieser Sequenz konnte schließlich die Erstellung von Primern und Sonden durchgeführt werden, die für eine TaqMan®-PCR erforderlich sind. Die Klonierung der Gerbil-Gene diente neben dem Erhalt von Sequenzinformationen zusätzlich zur Herstellung eines Plasmid-Standards. Für eine quantitative PCR muss die Anzahl der gemessenen Gen-Kopien mit einem vorgegebenen Standard verglichen werden. Auf dieser Grundlage wurden 26 verschiedene TaqMan®-Systeme etabliert.

Bei der Verarbeitung der Proben wurde zuerst die RNA isoliert und mit DNase verdaut, wodurch eine Fehlamplifizierung von genomischer DNA verhindert werden sollte. Dies wird normalerweise durch das Design von Primern verhindert, die Exon- und Intronengrenzen überspannen. Da das aufgrund der fehlenden Sequenzinformationen für Gerbils nicht möglich war, wurde die Behandlung mit DNase durchgeführt. Es konnte eine sehr gute Reduktion der genomischen DNA um ca. 99,8% erreicht werden (Daten aus Vorversuch, nicht gezeigt). Nach der Reversen Transkription wurde die erhaltene cDNA für die TaqMan®-PCR verwendet. Die quantitative Auswertung erfolgte mithilfe eines Plasmid-Standards, wobei das Plasmid das zu analysierende Gerbil-Gen enthielt. Dieser Standard wurde zuvor durch Messung der optischen Dichte auf eine definierte Anzahl Kopien des Plasmids pro ml eingestellt.

Bei Magengewebe wurde aufgrund der unterschiedlichen Probengröße und der damit verbundenen undefinierten Anzahl an Zellen eine sogenannte „Normalisierung“ nötig. Dazu wurde der Wert des gesuchten Gens durch das konstitutiv exprimierte Haushaltsgen HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) dividiert. Bei Zellkulturen, wie z.B. Dendritischen Zellen oder

Splenozyten, war dieses Vorgehen nicht nötig, da hier eine genau definierte Anzahl an Zellen verwendet wurde.

Der große Vorteil der quantitativen PCR ist die Möglichkeit einer sehr genauen Analyse von Expressionsprofilen direkt am Ort des Geschehens, also bei einer Infektion mit *H. pylori* direkt im Magengewebe. In dieser Arbeit sollte nun versucht werden, die Reaktion des Gerbil-Immunsystems auf eine Infektion mit *H. pylori* durch verschiedene immunologisch wirksame Substanzen oder durch eine präventive Immunisierung zu verändern und die Immunantwort mithilfe der zuvor etablierten Methoden zu analysieren.

### **6.3 Modulation der *H. pylori*-induzierten Immunantwort durch immunstimulatorische Oligodeoxynukleotide (ODNs)**

Eine Infektion mit *H. pylori* führt zu einer Th1-Immunantwort, in der Regel persistiert die Infektion jedoch lebenslang. CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODNs) sind für ihre Th1-verstärkende Wirkung bekannt (Sommer et al., 2004; Shi et al., 2005; Zhang et al., 2011). Dabei handelt es sich um bakterielle Sequenzmotive, die als „Alarmsignal“ auf eine Invasion durch Bakterien dienen und zu einer Aktivierung des Immunsystems führen. Der Austausch von nur einer Base (G statt C, also GpG-ODNs) führte zu einer suppressiven Wirkung in Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen (Ho et al., 2003; Ho et al., 2005; Jie et al., 2006; Graham et al., 2010). Die Wirkung dieser beiden gegensätzlichen Oligodeoxynukleotide auf die Infektion mit *H. pylori* könnte also einmal in einer möglichen Verstärkung der Immunantwort bzw. einer Suppression dieser liegen.

Um dies im Gerbil überprüfen zu können musste allerdings vorher ausgetestet werden, ob die verwendeten Sequenzabfolgen der ODNs, die eigentlich für Mäuse optimiert wurden, auch im Gerbil zu einer veränderten Reaktion des Immunsystems führen. Dazu wurden naive Gerbil-Splenozyten in Kultur genommen und mit verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen von CpG- und GpG-ODNs stimuliert. Naivität steht in diesem Zusammenhang für einen immunologischen Begriff und bedeutet, dass die Tiere bisher noch nicht mit *H. pylori* in Kontakt gekommen sind. Das Splenozyten-Modell ist eine einfache und zuverlässige Methode, um den Einfluss von Bakterien, bakteriellen Strukturen



oder auch einzelnen Substanzen auf den zellulären Zweig des Immunsystems zu beobachten (Deml et al., 2004). Die Analyse der Immunantwort erfolgte stellvertretend durch das proinflammatorische Zytokin IL-6, das sich durch seine stark gesteigerte Expression nach Stimulation mit ODNs auszeichnet (Klinman et al., 1996; Watrang et al., 2005; Knuefermann et al., 2007; Patel et al., 2008). Tatsächlich kam es bei steigender Konzentration von CpG-ODNs zu einer erhöhten Expression von IL-6. Wurde das CpG-ODN bei einer konstanten Konzentration belassen und zusätzlich aber das suppressive GpG-ODN zugegeben, so kam es zu einer Abnahme der IL-6 RNA-Expression. *In vitro* konnte also ein proinflammatorischer Vorgang durch CpG-ODN induziert und durch die zusätzliche Gabe von GpG-ODNs verringert werden. Nun stellte sich die Frage, ob dieser Effekt auch *in vivo* beobachtet werden kann und im Gerbil zu einer Veränderung der durch *H. pylori* ausgelösten Immunantwort führt.

Als Applikationsform der ODNs wurde eine intraperitoneale Injektion gewählt. Durch die hohe Resorptionskraft der Tunica serosa kann somit eine gute Aufnahme der verabreichten ODNs gewährleistet werden. Als Einzeldosis wurde jedem Gerbil eine Konzentration von 50µg ODNs injiziert. In der Arbeit von Chirgwin et al. wurden verschiedene CpG-Sequenzmotive intraperitoneal im Gerbil ausgetestet (Chirgwin et al., 2003). Hierbei kamen unterschiedliche Konzentrationen zum Einsatz und ein Bereich um 60µg stellte sich als optimale Konzentration mit dem größten immunstimulatorischen Potenzial heraus. In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der Kombination mit einem weiteren Antigen eine etwas verringerte Konzentration gewählt und dementsprechend 50µg eingesetzt. Die Injektion der ODNs erfolgte vor, während und nach den experimentellen Infektionen mit *H. pylori*. Das Experiment wurde nach vier Wochen Infektionsdauer beendet.

Eine Infektion mit *H. pylori* über vier Wochen zu beobachten, ist ein vergleichsweise kurzer Zeitraum. Für Gerbils werden normalerweise Zeiträume im Bereich von mehreren Wochen oder Monaten verwendet (Gamboa-Dominguez et al., 2007; Tatematsu et al., 2007; Franco et al., 2008; Toyoda et al., 2008; Flahou et al., 2010). Allerdings geht es hierbei oft um die Analyse des Vorgangs der Karzinogenese, was natürlich einen größeren Zeitrahmen erfordert. In dieser Arbeit ging es hauptsächlich um die Erstellung eines Immunprofils zu Beginn der Infektion, wofür sich das in der Arbeitsgruppe bei Mäusen etablierte

Kurzzeitinfektionsmodell von vier Wochen hervorragend eignet. Um eine Korrelation mit den histopathologischen Veränderungen in der Magenschleimhaut zu erreichen, wurde der speziell für diesen Zweck selektierte *H. pylori*-Stamm Ca117G verwendet (Ca117: Bezeichnung des ursprünglichen Patientenisolats, G: Gerbil-adaptiert). Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass er bereits nach kurzer Zeit zu einer ausgeprägten Gastritis im Magen führt. In einem später folgenden Versuchsteil mit Schwerpunkt auf der Beobachtung von längerfristigen Effekten, wurde zusätzlich eine Infektionsdauer von acht Wochen gewählt.

In allen infizierten Gerbils konnte eine erhöhte Produktion von gegen *H. pylori* gerichtetem Immunglobulin G beobachtet werden. Immunglobulin G wird erst in der Phase der adaptiven Immunantwort gebildet, bleibt dafür aber lange erhalten. Es ist ein sehr guter Nachweis für eine bereits länger andauernde oder durchgemachte Infektion. *H. pylori* führte also zu einer Aktivierung des humoralen Immunsystems, die im Gegensatz zur zellulären Immunität über Antikörper vermittelt wird. Genauere Aussagen wären nur durch eine Untersuchung der verschiedenen Iso- und Subtypen der Antikörper möglich gewesen. So deuten sekretiertes IgG2a und IgG3 bei Mäusen und Menschen auf eine Th1-Immunantwort hin, während das Vorhandensein von IgG1 und IgE für Th2 spricht (Brinkmann et al., 1997; Yoh et al., 2003). Die für eine solch differenzierte Analyse erforderlichen Antikörper sind jedoch nicht für Gerbils erhältlich. Der gemessene Antikörpertiter eignet sich allerdings sehr gut zur Beurteilung der Effektivität der experimentellen Infektion mit *H. pylori*. In nicht-infizierten Tieren wurden deutlich niedrigere Titer festgestellt, als in infizierten Gerbils. Mithilfe dieser Methode kann allerdings nur ein zuvor stattgefundener Kontakt mit *H. pylori* bestätigt werden, es handelt sich um keinen direkten Bakteriennachweis. Dies kann durch einen positiven PCR-Nachweis des *H. pylori* Urease-Gens im Magengewebe durchgeführt werden. Der große Vorteil der PCR-Methode ist der direkte Nachweis von DNA im Gewebe, die Tiere mussten also zuvor stabil mit dem Bakterium infiziert worden sein. Andererseits ist damit auch eine Unterscheidung von *H. pylori* und anderen Subspezies möglich, die natürlicherweise den Magen kolonisieren (Mahler et al., 1998; Zhang et al., 2005). Durch die Kombination von Antikörpertiterbestimmung und PCR-Nachweis konnte daher eine sichere Identifikation von erfolgreich infizierten oder nicht-infizierten Tieren erreicht werden.

Bei allen infizierten Gerbils wurde nach der Infektion mit *H. pylori* histologisch eine ausgeprägte Infiltration von Entzündungszellen nachgewiesen. Diese beschränkte sich allerdings auf die Lamina und reichte nicht in die Tiefe des Bindegewebes der *Tunica muscularis*. Ebenso konnten in allen infizierten Tieren Gewebedysplasie (Veränderungen der Gewebestruktur) und Lymphfollikel (Ansammlung von Entzündungszellen) beobachtet werden. Die Ausprägung der histopathologischen Veränderungen ist dabei von einer Reihe von Faktoren abhängig, der wichtigste ist wohl der zur Infektion verwendete Stamm. Besonders CagA scheint in Bezug auf die Pathogenität des einzelnen Bakterienstamms eine große Rolle zu spielen. So zeigten sich bei Arbeiten mit Gerbils mit Cag-positiven Stämmen generell verstärkte Reaktionen im Magengewebe (Hirayama et al., 1996a; Honda et al., 1998b; Kirchner et al., 2001; Chen et al., 2007). Stämme aus dem asiatischen Raum besitzen gegenüber europäischen Stämmen eine erhöhte Aggressivität, da sie in fast allen Fällen eine Pathogenitätsinsel besitzen (Blaser et al., 2001). Auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten Ca117G handelt es sich um einen CagA<sup>+</sup> Stamm. Die Fähigkeit des Bakteriums zur Kolonisierung und der Ausprägungsgrad der Veränderungen in der Magenschleimhaut sind also vor allem vom verwendeten Stamm abhängig.

Das immunologische Zusammenspiel von angeborener und adaptiver Immunantwort im Magen bei einer Infektion mit *H. pylori* ist sehr komplex. Zusammenfassend konnte in diesem Versuchsteil durch quantitative PCR in allen infizierten Gerbils eine gesteigerte RNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  im Magen nachgewiesen werden. Durch den Einsatz von ODNs wurden zusätzlich die ebenfalls proinflammatorisch wirksamen Zytokine IL-6, TNF und IL-18 verstärkt exprimiert. Eine erhöhte RNA-Expression der für eine Th2-Immunantwort bedeutendsten, antiinflammatorisch wirksamen Zytokine IL-4 und IL-10 konnten hingegen nicht nachgewiesen werden. Die Expression von iNOS war in allen infizierten Tieren stark gesteigert und deutete damit auf erhöhten nitrosativen Stress hin. Die beiden Chemokine KC und Mip-2, murine Homologe für IL-8, wurden ebenfalls verstärkt exprimiert. Eine gesteigerte RNA-Expression der beiden Toll-like Rezeptoren TLR4 und TLR9, beide von Bedeutung bei der Erkennung von bakteriellen Zellwandbestandteilen, wurde in allen infizierten Gerbils nachgewiesen. In Kombination mit Ergebnissen aus der



Der Kontakt von *H. pylori* mit den Zellen des Magenepithels verläuft über eine Reihe von Oberflächenrezeptoren, wobei Toll-like Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Induktion intrazellulärer Signalwege spielen. Durch die Bindung von bakteriellen Bestandteilen kommt es zu einer Aktivierung von Makrophagen, welche daraufhin proinflammatorische Zytokine produzieren. Dendritische Zellen nehmen die Antigene von *H. pylori* auf und prozessieren diese, um sie dann an CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen zu präsentieren. Aktivierte T-Helfer-Zellen führen über die Produktion von IFN- $\gamma$  zu einer Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Das sekretierte IFN- $\gamma$  führt aber auch zu einer weiteren Aktivierung vom Makrophagen, wodurch noch mehr proinflammatorische Zytokine produziert werden. Eine Gegenregulation über IL-10, welches die Aktivierung von Makrophagen einschränken kann, scheint im Fall einer Infektion mit *H. pylori* nicht stattzufinden.

(Einzelabbildungen aus: <http://www.madrimasd.org/blogs/microbiologia/2009/02/21/113252>; Abbas et al., 2003)

Konservierte bakterielle Strukturen, sogenannte PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) werden über Toll-like Rezeptoren erkannt und führen zu einer Aktivierung einer Reihe von wichtigen intrazellulären Signalwegen (Wang et al., 2002). LPS von Gram-negativen Bakterien interagiert mit TLR-4 und induziert die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, außerdem beeinflusst TLR4 die Aktivierung von TLR2 (Uno et al., 2007; Anand et al., 2008). Bakteriell Lipoprotein und Peptidoglykane von Gram-positiven Bakterien werden vor allem durch TLR2 erkannt. Bakterielle CpG-DNA kann direkt an TLR9 binden. Diese CpG-Motive kommen in Bakterien etwa 20mal häufiger vor als in Säugetieren und sind ein Alarmsignal für eine bakterielle Invasion (Krieg, 2002). Die Bindung an TLR9 führt zu einer Aktivierung von Makrophagen (Schroder et al., 2007). Außerdem wird in Kooperation mit TLR4 die Freisetzung von IL-12 aus DCs angeregt, welches zur Stimulation von Th1-Zellen führt und damit ein Verbindungsglied zur adaptiven Immunantwort darstellt (Theiner et al., 2008). Zusätzlich stimuliert TLR9 die Produktion von IFN- $\gamma$  aus NK-Zellen, welches wiederum zur Aktivierung von Makrophagen führt (Roda et al., 2005). TLR9 spielt also eine wichtige Rolle bei der Induktion von Th1-Immunantworten (Ito et al., 2007). Aufgrund seiner evolutionär veränderten Flagellen-Struktur kann *H. pylori* nicht über TLR5 detektiert werden (Sanders et al., 2006; Galkin et al., 2008). Nachdem bakterielle Bestandteile von *H. pylori* durch Toll-like-Rezeptoren erkannt wurden, kommt es zu einer Aktivierung von Makrophagen. Diese sekretieren frühe proinflammatorische Zytokine und leiten damit direkt zellpathologische Effekte ein.

In der frühen Phase der Immunantwort spielt auch die Expression von iNOS eine wichtige Rolle. Dieses Enzym ist für die Entstehung von bakterizid wirksamem nitrosativen Stress verantwortlich. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Produktion von iNOS durch IFN- $\gamma$  stark gesteigert werden kann (Utaisincharoen et al., 2004). Die Stimulation von Makrophagen führte zur Expression von frühen proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. TNF, IL-12, IL-1 $\beta$  und IL-18. Diese werden allerdings nicht nur von Makrophagen gebildet, sondern von einer Vielzahl an Immunzellen. Der wichtigste Stimulus für die Expression von TNF und IL-18 ist das LPS von Gram-negativen Bakterien (Kohn et al., 1995; Freudenberg et al., 2003). Die Sekretion von TNF durch LPS-stimulierte Makrophagen konnte durch die Wirkung von IFN- $\gamma$  weiter verstärkt werden (Berner et al., 2005). IL-18 führte wiederum zu einer Produktion von IFN- $\gamma$  durch NK und T-Zellen (Kawashima et al., 2004). Besonders in Kombination mit IL-12 ist IL-18 damit ein Vermittler der zellulären Immunität.

Dendritische Zellen werden sowohl durch direkten Kontakt mit den Antigenen von *H. pylori* als auch über den durch bakterielle Bestandteile aktivierten TLR9-Rezeptor vermittelt aktiviert und sekretieren das frühe proinflammatorische Zytokin IL-12. Dieses regt wiederum die Produktion von IFN- $\gamma$  aus NK-Zellen an, welches zu einer weiteren Aktivierung von Makrophagen führt (Parihar et al., 2002; Zhang et al., 2010). Die bakteriellen Antigene werden von DCs aufgenommen, prozessiert und auf der Zelloberfläche präsentiert. Hier können sie nun mit CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen interagieren, wodurch sich der weitere Verlauf der Immunantwort entscheidet. Bei der Infektion mit *H. pylori* kommt es zu einer Produktion von IL-12 durch DCs, wodurch eine Th1-dominante Immunantwort induziert wird (Guiney et al., 2003; Mitchell et al., 2007). Wäre zu diesem Zeitpunkt das Zytokinemilieu vom antiinflammatorisch wirksamen IL-4 geprägt, würde es zu einer Th2-Reaktion des Immunsystems kommen (Webb et al., 2007; Guenova et al., 2008). Die CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen sekretieren aufgrund des zuvor produzierten IL-12 nur das Th1-vermittelnde Zytokin IFN- $\gamma$  (D'Elios et al., 2005). Dadurch kommt es zu einer Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen.

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass eine Infektion mit *H. pylori* in Gerbils zu einer starken Produktion von gegen das Bakterium gerichteten Antikörpern führt. Durch den Einfluss von IFN- $\gamma$  kommt es weiterhin zu einer

Aktivierung von Makrophagen. Diese sekretieren proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie MIF, KC und Mip-2, die eine Rekrutierung von Entzündungszellen, z.B. Neutrophilen, an den Ort der Infektion bewirken (D'Elia et al., 2005). Neutrophile spielen eine wichtige Rolle bei der initialen Immunantwort und können durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies Bakterien oder befallenen Gewebereiche abtöten (Kobayashi, 2008). Von Makrophagen exprimiertes IL-6 trägt ebenfalls zur Differenzierung von Plasmazellen bei. Dabei ist die Expression dieser Zytokine und Chemokine nicht nur auf Makrophagen beschränkt, sondern sie werden von einer Vielzahl an Immunzellen produziert.

Eine erhöhte Sekretion von IL-4, einem charakteristischen Th-2 Zytokin, konnte in diesem Versuchsteil nicht beobachtet werden. Auch scheint keine Gegenregulation der Entzündungserscheinungen über IL-10, welches die Aktivierung von Makrophagen einschränken kann, stattzufinden (Ding et al., 1993; Wang et al., 2001b; Kurnatowski et al., 2010). Dabei könnte es sich möglicherweise um ein methodisches Nachweisproblem handeln, da regulatorische Zytokine wie IL-4 bereits in sehr geringen Konzentrationen wirksam sind (Guenova et al., 2008). Allerdings handelt es sich bei der quantitativen PCR um eine sehr empfindliche Nachweismethode, so dass diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich scheint. Vielmehr könnte die nur basale Expression antiinflammatorischer Zytokine auf die Ursache für die starken histopathologischen Veränderungen hindeuten, die in der Magenschleimhaut von Gerbils sichtbar waren. Durch die ständige Aktivierung proinflammatorischer Vorgänge kommt es über einen längeren Zeitraum zu immer stärkeren Gewebeschäden.

Zusammenfassend wurde durch den Einsatz von CpG- und GpG-ODNs eine größere Anzahl an proinflammatorischen Zytokinen exprimiert, die Stärke der Expression war allerdings mit der von nur mit *H. pylori* infizierten Gerbils vergleichbar. Durch die Verabreichung von sowohl CpG- als auch GpG-ODNs zeigte sich eine Modulation der Immunantwort in Richtung Th1. Es kam jedoch weder beim Expressionsprofil des Magens noch bei Betrachtung der histologischen Befunde zu einem signifikanten Unterschied gegenüber den infizierten, aber nicht mit ODNs behandelten Kontrolltieren.

Die möglichen Gründe hierfür sind vielfältig. Die verwendeten ODN-Sequenzen waren eigentlich für das Mausmodell entwickelt und optimiert. Während CpG-

ODNs mittlerweile vereinzelt auch bei Gerbils eingesetzt werden (Chirgwin et al., 2003; Ivory et al., 2007), beschränkt sich die Verwendung von GpG-ODNs weiterhin auf Mäuse (Ho et al., 2005; Jie et al., 2006; Graham et al., 2010). Aufgrund der wenigen Untersuchungen zur Wirkungsweise von ODNs im Gerbil könnte es also sein, dass sich trotz der zuvor durchgeführten *in vitro* Austestung im Splenozyten-Modell, der immunstimulatorische Effekt im Infektionsgeschehen mit *H. pylori in vivo* so nicht zeigt. Möglicherweise war auch die intraperitoneale Verabreichung nicht der optimale Weg. Der Austausch der Peritonealhöhle mit der Milz funktioniert zwar sehr gut, es scheint allerdings Probleme beim Transport zu den regionalen Lymphknoten zu geben (Chirgwin et al., 2003). Im folgenden Versuchsteil wurde das CpG-ODN allerdings intranasal verabreicht und es zeigte sich auch auf diesem Weg keine grundlegende Veränderung der Immunantwort. Eine unzureichende Dosis scheint ebenso wenig in Frage zu kommen. In der Arbeit von Chirgwin et al. wurden verschiedene CpG-Sequenzmotive in unterschiedlichen Konzentrationen im Gerbil ausgetestet und der dort ermittelte optimale Bereich der Dosis wurde auch hier verwendet (Chirgwin et al., 2003). Möglicherweise waren die durch *H. pylori* ausgelösten Reaktionen des Immunsystems zu stark, um durch die Applikation von CpG-ODNs noch gesteigert werden zu können. Der in dieser Arbeit verwendete *H. pylori*-Stamm wurde aufgrund der in Vorversuchen ermittelten, stark entzündlichen Reaktionen im Magengewebe ausgewählt. Vielleicht wäre daher mit einem weniger pathogenen Stamm eine Steigerung der Immunreaktion durch CpG-ODNs nachweisbar gewesen. Es zeigte sich allerdings auch bei Wong et al., dass die durch eine *H. pylori*-Infektion ausgelöste Th-1 Immunantwort bei Mäusen durch die Applikation von ODNs nicht verändert werden konnte (Wong et al., 2009). Die alleinige Verabreichung von ODNs führt also höchstwahrscheinlich auch bei Gerbils nicht zur erwarteten Modulation der Immunreaktion. Zur Induktion einer starken Immunantwort vor der Infektion mit *H. pylori* wurde deshalb im nächsten Versuchsteil eine vorhergehende Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat durchgeführt, da Lysat für seine starke Immunogenität bekannt ist (Harbour et al., 2008; Flahou et al., 2009). Die verschiedenen immunstimulatorischen Adjuvanzen wurden nun zusätzlich zugegeben



## **6.4 Modulation der *H. pylori*-induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen**

Die durch eine Infektion mit *H. pylori* ausgelöste Th1 Immunantwort bewirkt keine erfolgreiche Eradikation des Bakteriums. Eine Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat und CpG-ODN führte in Mäusen zu einer lokalen und systemischen Th1-Immunantwort (Sommer et al., 2004). Cholera-Toxin (CT) ist hingegen als starkes Th2-Adjuvanz bekannt (Sauma et al., 2011). Somit könnte es bei einer Kombination aus Lysat und CpG-ODN zu einer Verstärkung der Th1-Immunreaktion gegen *H. pylori* kommen, wohingegen bei einem Einsatz von CT der regulatorische Effekt einer Th2-Immunantwort überwiegen könnte. In Mäusen wurde durch die Kombination von Lysat und den beiden Adjuvanzen CpG-ODN und CT ein synergistischer Effekt der Immunaktivierung beobachtet, der zu einer sterilen Immunität führte (Jiang et al., 2003). Dies bedeutet, dass aus dem Magengewebe der Tiere kein *H. pylori* mehr nachgewiesen werden konnte. Die Wirksamkeit einer Immunmodulation durch die Kombination von unterschiedlichen Immunisierungsstrategien sollte nun in diesem Versuchsteil im Gerbil weiter untersucht werden. Da die histopathologischen Veränderungen in der Magenschleimhaut bei diesem Tiermodell stärker ausgeprägt sind als bei Mäusen, sollte eine Korrelation zwischen Gewebeschädigung und dem Profil der ausgelösten Immunantwort auftreten. Bei Jiang et al. wurde eine sterile Immunität der Tiere beobachtet, allerdings erfolgte die Auswertung dieses Befunds bereits nach zwei Wochen, was Zweifel an dem methodischen Vorgehen aufkommen lässt. Deshalb wurde in diesem Versuchsteil zur Überprüfung eines Langzeiteffekts zusätzlich zum Kurzzeitinfectionsmodell von vier Wochen Infektionsdauer ein Zeitintervall von acht Wochen gewählt; außerdem wurde als Analysemethode ein Anzuchtversuch von *H. pylori* aus dem Magengewebe zur Bestimmung der Kolonisationsdichte durchgeführt.

Mit einer Immunisierung werden Erreger- oder Erregerbestandteile injiziert, die eine protektive Immunantwort auslösen sollen. Diese Reaktion soll dann beim Kontakt mit dem Antigen zu einer schützenden Abwehrreaktion führen. Das hier verwendete *H. pylori*-Lysat, also durch Ultraschall zertrümmerte Bakterien, führt zu einer starken Aktivierung des Immunsystems. Besonders das LPS des Bakteriums

fördert dabei die Induktion einer Th1-geprägten Immunantwort (Taylor et al., 2008). Wurde das LPS vorher entfernt, kam es in Mäusen zu einer starken Th2-Reaktion (Taylor et al., 2006). Durch die zusätzliche Verwendung von Adjuvanzen kann die Immunantwort in eine gezielte Richtung gelenkt werden. CpG-ODNs sind für ihre Th1-verstärkende Wirkung bekannt (Sommer et al., 2004; Shi et al., 2005; Fonseca et al., 2011). Auch wenn das CpG-ODN im vorherigen Versuchsteil scheinbar zu keiner Steigerung der durch *H. pylori* ausgelösten Immunantwort beigetragen hat, wurde es hier nochmals verwendet, da nun eine andere Verabreichungsrouten gewählt wurde. Durch eine mucosale Verabreichung scheint eine verbesserte Wirkung von ODNs stattzufinden (Nystrom-Asklin et al., 2008; Pun et al., 2009). Die Kombination aus *H. pylori*-Lysat und CpG-ODN führte in einem Mausmodell bei oraler Gabe zu einem Schutz vor einer Infektion mit *H. pylori* (Taylor et al., 2008). Die definierte Wirkung des CpG-ODNs zeichnet es als idealen Adjuvanz-Gegenspieler zum zusätzlich verwendeten CT aus.

CT ist ein Enterotoxin, das von *Vibrio cholerae* produziert wird. Wenn es als mucosales Adjuvanz verabreicht wird, ist es in der Lage CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Produktion von Th2-Zytokinen anzuregen (Feng et al., 2008; Lee et al., 2009). In der Arbeit von Yura et al. sollte die Wirkung von CT in einem Mausmodell mit experimentell ausgelöster Enzephalomyelitis, die zu einer Th1-Immunantwort führt, untersucht werden. Durch die Gabe von CT konnte die Expression von IL-12 und IFN- $\gamma$  gesenkt werden und dadurch auch die Ausprägung der Symptome (Yura et al., 2001). In einem murinen Allergie-Mausmodell wurde durch die Verabreichung von Allergen plus CpG-ODN eine Inhibition der IgE-Sekretion beobachtet. Im Gegensatz dazu führte die Kombination aus Allergen plus CT zu einer Produktion von IL-4 und IgG1 (Huang et al., 2007). Ein murines Infektionsmodell mit *H. felis* konnte durch die Kombination aus Lysat, CpG-ODN und CT einen synergistischen Effekt erreichen, der zu einer sterilen Immunität der Tiere führte (Jiang et al., 2003).

Um die Kolonisationsdichte von *H. pylori* im Magen bestimmen zu können, erfolgte zusätzlich zu den bisher benutzten Auswertungsmethoden ein Anzuchtversuch des Bakteriums. Die Verabreichung der Immunisierung wurde im Gegensatz zum vorherigen Versuchsteil intranasal durchgeführt. Die Gründe hierfür liegen einmal in der zuvor beobachteten geringen Wirkung von ODNs bei intraperitonealer Gabe. CT scheint seine Wirkung als Adjuvanz bei musosaler Verabreichung

optimal zu entfalten (Smits et al., 2009; Lee et al., 2009). Die sterile Immunität bei einer Kombination der beiden Adjuvanzen CpG und CT wurde in der Arbeit von Jiang et al. ebenfalls durch intranasale Gabe erreicht (Jiang et al., 2003). Bei mucosaler Applikation ist jedoch die Immunogenität der verabreichten Antigene oftmals relativ gering. Während eine parenterale Immunisierung meist nur zwei Injektionen in kurzem zeitlichen Abstand erfordert (Grundimmunisierung und Boost), muss bei einer mucosalen Immunisierung das Antigen meist öfter als zweimal verabreicht werden. Auch im Mausmodell von Jiang et al. erfolgte die Immunisierung fünf Mal mit jeweils zwei Wochen Abstand (Jiang et al., 2003).

Die Verabreichung der Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat führte in infizierten Gerbils bereits nach vier Wochen zu einer starken Produktion von gegen *H. pylori* gerichtetem IgG. Ohne Immunisierung lediglich mit Infektion stabilisierten sich die IgG-Werte erst nach acht Wochen auf einem hohen Niveau, blieben jedoch immer unter denen der Tiere zurück, die mit Lysat immunisiert wurden. Diese Antikörper schienen allerdings keinerlei Schutzfunktion auszuüben. Durch die Verwendung von genetisch veränderten Mäusen und einer aktiven Immunisierung bestehend aus *H. pylori*-Antigenen und Adjuvanz konnte gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Hauptvermittler eines Schutzes gegen das Bakterium sind. Antikörper spielen für die Protektion bei einer Infektion mit *H. pylori* keine oder nur eine geringe Rolle (Nedrud, 2001; Gorrell et al., 2009).

Die Identifizierung von infizierten und nicht-infizierten Gerbils konnte anhand des Antikörpertiters sehr zuverlässig erfolgen. Die PCR des Urease-Gens von *H. pylori* aus dem Magengewebe ergab hingegen in einigen Fällen widersprüchliche Ergebnisse. Durch die Kombination dieser beiden Methoden wurde die Sensitivität des Nachweises einer erfolgreichen Infektion gesteigert. Mithilfe des zusätzlich durchgeführten Anzuchtversuchs zur Feststellung der Kolonisierungsdichte im Magen, lies sich durch einen Vergleich der mit den jeweiligen Einzelmethoden erzielten Ergebnisse eine sehr sichere Identifizierung von infizierten und nicht-infizierten Gerbils durchführen.

In manchen Fällen führte eine experimentelle Infektion nicht zu einer dauerhaften Kolonisierung mit *H. pylori*. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt. Diese so genannte spontane Eradikation kann jedoch auch beim Menschen beobachtet werden (Buzas, 2010). *H. pylori* ist zwar ein empfindliches Bakterium, das eine CO<sub>2</sub>-haltige Atmosphäre zum optimalen Wachstum benötigt, jedoch konnte dieses

Problem durch schnelles experimentelles Vorgehen, ein ständiges Durchwechseln der Tiergruppen während der Infektionsphase und dem Verabreichen einer hohen Bakteriendichte minimiert werden (Bury-Mone et al., 2006). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass es in diesen vereinzelt Tieren aus unbekannten Gründen von Anfang an zu gar keiner Infektion kam. Denn eine erfolgreiche Reaktion des Immunsystems führt meistens zur Bildung von Antikörpern, die aber in diesen Fällen nicht nachweisbar waren. Hierbei spielt möglicherweise auch die große genetische Variabilität der verwendeten Auszucht-Tiere eine Rolle.

Eine signifikante Reduktion des Wachstums von *H. pylori* aus dem Magengewebe konnte vier Wochen nach der Infektion in den Gerbils festgestellt werden, die mit einer Kombination aus Lysat, CpG-ODN und CT immunisiert wurden. Nach acht Wochen war eine Abnahme der Kolonisationsdichte nur in der mit Lysat und CT behandelten Gruppe sichtbar. Somit war eine Reduktion des Bakterienwachstums wahrscheinlich auf den Einsatz von CT zurückzuführen und unabhängig von der verwendeten Adjuvanz-Kombination. Vor kurzem wurde von Taylor et al. in einem Mausmodell durch den Einsatz von CT keine Reduktion der Kolonisierungsdichte mit *H. pylori* festgestellt, in Kombination mit CpG-ODN kam es jedoch zu einer Abnahme des Bakterienwachstums (Taylor et al., 2008). Dieser Effekt konnte hier nicht bestätigt werden. Allerdings erfolgte die Feststellung der Kolonisierungsdichte in der zuvor erwähnten Arbeit bereits nach acht Tagen und hier erstreckte sich die Untersuchung des Magens auf die deutlich längeren Zeiträume von vier und acht Wochen.

Der Hauptgrund für die Verwendung einer Kombination aus Lysat, CpG-ODN und CT war die in der Arbeit von Jiang et al. beobachtete sterile Immunität (Jiang et al., 2003). Diese Form der Immunantwort, mit der durch eine Immunisierung die komplette Kolonisierung mit *H. pylori* verhindert werden konnte, wäre natürlich auch unter präventiven oder therapeutischen Gesichtspunkten sehr interessant. Eine sterile Immunität konnte jedoch im Gegensatz zur Maus im Gerbil nicht beobachtet werden. Das lag wahrscheinlich am untersuchten Zeitraum. Während bei Jiang et al. das Experiment bereits nach zwei Wochen beendet wurde (Jiang et al., 2003), erstreckte sich der hier untersuchte Zeitraum über vier und acht Wochen. Um eine chronische Erkrankung wie die Infektion mit *H. pylori* zu untersuchen, scheint also ein längerer Zeitraum sinnvoller zu sein.

Histologisch konnten in der Magenschleimhaut von nicht-infizierten Gerbils keine Veränderungen beobachtet werden. Mit *H. pylori* infizierte Tiere zeigten nach vier Wochen Infektionsdauer eine ausgeprägte Infiltration von Entzündungszellen, die bis zur *Tela submucosa* reichte. Auch Hyperplasie und Dysplasie konnten nachgewiesen werden und es kam zur Ausprägung von Lymphfollikeln oder Vorstufen dazu in der Magenschleimhaut. Insgesamt konnte eine Verstärkung der Entzündungserscheinungen nach acht Wochen Infektionsdauer mit *H. pylori* im Vergleich zu vier Wochen beobachtet werden. Durch die Verwendung von CT wurde allerdings in allen Gerbils eine verstärkte Entzündungsreaktion festgestellt. Ob diese jedoch im weiteren zeitlichen Verlauf zu einer Eradikation des Bakteriums geführt hätte oder ob es dadurch zu schwerwiegenderen Gewebeschäden gekommen wäre als durch eine Infektion mit dem Bakterium allein, kann aufgrund des Zeitrahmens von maximal acht Wochen nicht beurteilt werden.

Das Zytokin IL-6 wurde ursprünglich als charakteristisch für eine Th2-Reaktion angesehen, da es die Entwicklung von Antikörpern fördert (Doganci et al., 2005; Tucci et al., 2007). In manchen Arbeiten erfolgte die Einstufung von IL-6 jedoch als Th1-Zytokin (Garcia-Zepeda et al., 2007). Eine eindeutige Zuordnung ist also umstritten, weshalb IL-6 allgemein als proinflammatorisches Zytokin betrachtet wird (Odenbreit et al., 2006). Die Expression von IL-12 konnte in infizierten Gerbils nach vier Wochen durch eine Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat und den beiden Adjuvantien CpG-ODN und CT induziert werden. Acht Wochen nach der Infektion wurde nur noch in Kombination mit CT eine stark erhöhte Expression von IL-12 festgestellt. IL-12 ist für seine zentrale Rolle als Mediator einer vor *H. pylori* schützenden Immunantwort bekannt, die in IL-12 Knockout-Mäusen durch eine Immunisierung mit Lysat und CT nicht erreicht werden konnte (Akhiani et al., 2002). Beim Menschen führte die Verabreichung von *H. pylori*-Bestandteilen (u.a. auch Lysat) zu einer Induktion von IL-12 (Meyer et al., 2000). IL-12 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das sehr früh im Infektionsverlauf gebildet wird und die grundlegende Richtung der Immunantwort beeinflusst. Deshalb ist die Abnahme der IL-12 Expression in Lysat und CpG-ODN immunisierten Gerbils nach acht Wochen nicht ungewöhnlich. Sehr viel auffälliger ist jedoch die Produktion von IL-12 in CT-behandelten Tieren, da CT eigentlich als starker Inhibitor von IL-12 bekannt ist (Braun et al., 1999; Coccia et al., 2005; la Sala et

al., 2009). In Kombination mit *H. pylori*-Lysat führte es in dieser Arbeit jedoch zu einer starken Expression des proinflammatorischen Zytokins. Das im Lysat enthaltene LPS, das hauptsächlich zur Induktion von Th1-geprägten Immunreaktionen führt, konnte dafür nicht verantwortlich sein. Erstens besitzt das LPS von *H. pylori* im Vergleich zu beispielsweise *E. coli* deutlich weniger endotoxische Aktivität (Yokota et al., 2007). Und zweitens konnte bei Verabreichung von Lysat in Kombination mit CpG-ODN nach acht Wochen keine gesteigerte Expression von IL-12 mehr festgestellt werden. Diese proinflammatorische Wirkung war also spezifisch für CT, was eigentlich gegen CT als typisches Th2-Adjuvanz spricht. MIF, ein proinflammatorisches Zytokin, das nach vier Wochen kaum verstärkt produziert wurde, zeigte nach acht Wochen in allen infizierten Gerbils eine starke Expression. MIF kann zur Produktion anderer entzündlicher Zytokine beitragen, es hat jedoch auch die Fähigkeit, die durch Glucocorticoide vermittelte Suppression von Entzündungsreaktionen aufzuheben (Nishihira, 2000). Eine in dieser Arbeitsgruppe durchgeführte Diplomarbeit konnte mithilfe von *in situ* Hybridisierung die Expression von MIF in *H. pylori* infizierten Gerbils auf den Bereich von Lymphfollikeln eingegrenzen (Röhl, 2005). Nur dieses Zytokin zeigte eine derart begrenzte Expression in den Bereichen mit großer Zellschädigung. Die Stärke der MIF-Expression scheint dabei vom Cag-PAI-Status des Bakteriums abzuhängen und führte zu verstärkter Apoptose in Magenepithelzellen und einer erhöhten Produktion von wirtseigenen Faktoren, die ihrerseits karzinogene Prozesse fördern (Kusters et al., 2006). Die nach acht Wochen beobachteten verstärkten histopathologischen Veränderungen könnten daher mit der gesteigerten RNA-Expression von MIF in genau diesen Bereichen korrelieren.

Das für eine Th2-Immunantwort charakteristische Zytokin IL-4 wurde bei allen Gerbils nur basal exprimiert. Die Verabreichung von CT als Adjuvanz führt aber normalerweise zu einer starken Produktion dieses antiinflammatorischen Zytokins (Marinaro et al., 1995; Chi et al., 1999; Takaishi et al., 2007; Feng et al., 2008). Da IL-4 ähnlich wie IL-12 zu einem frühen Zeitpunkt der Immunreaktion gebildet wird, war der Zeitraum nach vier Wochen möglicherweise schon zu lang, um IL-4 noch nachweisen zu können. Die Kombination mit *H. pylori*-Lysat könnte aber auch zu gar keiner Induktion einer erhöhten IL-4-Expression geführt haben. Besonders das LPS des Bakteriums fördert nämlich eine Th1-geprägte Immunantwort. Wurde das

LPS entfernt, konnte in Mäusen eine starke Th2-Reaktion ausgelöst werden (Taylor et al., 2006). Im Endeffekt handelte es sich also bei der hier hervorgerufenen Reaktion des Immunsystems trotz der Verwendung von CT um keine eindeutige Th2-Immunantwort. Im Gegensatz zu IL-4 konnte die erhöhte Expression von IL-10 bei infizierten Gerbils nach vier Wochen durch eine Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat und den beiden Adjuvanzen CpG-ODN und CT induziert werden. Acht Wochen nach der Infektion wurde IL-10 jedoch nur noch in Kombination mit CT verstärkt exprimiert. Durch die Präsentation von Antigenen von APZ an CD4<sup>+</sup> T-Zellen kommt es über die Produktion von IL-12 zur Bildung von IFN- $\gamma$ , was wiederum zur Aktivierung von Makrophagen führt. Aktivierte Makrophagen führen durch die Phagozytose von *H. pylori* zu Gewebeschädigungen, gleichzeitig sekretieren sie jedoch auch IL-10. IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, das durch eine negative Feedback-Schleife eine zu starke Ausprägung von Zellschäden verhindert (Trinchieri, 1997; Ogawa et al., 2008). Mithilfe der Wirkung von IL-10 kommt es dann zu einer verringerten Präsentation von Antigenen an der Oberfläche und damit zu einer reduzierten Sekretion von IL-12, womit eine unkontrollierte Aktivierung von Makrophagen verhindert wird (Abbas et al., 2003). IL-10 kann jedoch nicht nur von Makrophagen gebildet werden, sondern auch von T-Zellen, hierbei besonders von regulatorischen T-Zellen (Sayi et al., 2011). In der Arbeit von Harris et al. wurde die Aktivität von regulatorischen T-Zellen in mit *H. pylori* infizierten Patienten untersucht, die besonders bei Kindern stark ausgeprägt war und mit einer gesteigerten Expression von IL-10 einherging. Die Ausprägung der Gastritis war bei ihnen dadurch im Vergleich zu Erwachsenen verringert (Harris et al., 2008). Während in der Literatur für IL-10 vor allem eine regulierende Wirkung beobachtet wurde, führte es in dieser Arbeit allerdings in keiner der immunisierten Tiergruppen zu einer Regulation der Entzündungserscheinungen. In den mit CT behandelten Gerbils konnten sogar verstärkte histopathologische Veränderungen beobachtet werden. Eine vorhandene Expression von IL-10 kann also nicht immer mit einer Schutzfunktion vor zu starken Gewebeschäden korreliert werden.

Die Expression von iNOS war in allen infizierten Gerbils stark gesteigert und deutete damit auf erhöhten nitrosativen Stress hin, welcher durch eine Infektion mit *H. pylori* ausgelöst wird (Naito et al., 2008; Qu et al., 2009). Dabei handelt es sich um einen bakteriziden Mechanismus der angeborenen Immunantwort, der

durch die Aktivierung von TLRs initiiert werden kann (Uno et al., 2007). Die beiden Chemokine KC und Mip-2, murine Homologe für IL-8, zeigten bei allen infizierten Gerbils ebenfalls eine verstärkte Expression, die durch die Verabreichung der Immunisierung mit Lysat noch gesteigert werden konnte. Auch bei Mäusen ist aus der Literatur eine verstärkte Produktion von KC und Mip-2 bekannt (Park et al., 2008; DeLyria et al., 2009). Es konnte damit jedoch kein Schutz vor einer Infektion mit dem Bakterium erreicht werden (Garhart et al., 2003).

Durch die Immunisierung der Gerbils mit Lysat kam es nach vier Wochen zu einer starken Expression von TLR9 in allen infizierten Tieren. Die Erkennung von *H. pylori*-DNA stellt dabei ein wichtiges Element der Helicobacter-induzierten intrazellulären TLR-Signalwege dar (Rad et al., 2009). Nach acht Wochen konnte in allen infizierten Gerbils eine gesteigerte Expression von TLR4 und TLR9 beobachtet werden, wobei TLR9 durch die Verabreichung von CT eine stark erhöhte Expression zeigte. Ebenso wie in der Literatur konnte eine verstärkte Expression von TLR4 und TLR9 durch eine Infektion mit *H. pylori* auch in dieser Arbeit bestätigt werden (Schmausser et al., 2004; Chang et al., 2004; Asahi et al., 2007; Obonyo et al., 2007). TLR2 wurde nur mithilfe einer kombinierten Immunisierung mit Lysat und CT verstärkt exprimiert, nicht jedoch durch eine alleinige Infektion mit *H. pylori*. Das ist insofern verwunderlich, da viele Arbeiten aus der Literatur TLR2 eine Schlüsselrolle bei der Erkennung von *H. pylori* zuweisen (Alvarez-Arellano et al., 2007; Chaouche-Drider et al., 2009). Dieses Ergebnis konnte mit diesem Versuchsaufbau allerdings nicht bestätigt werden. TLR5 wurde in allen Gerbils sowohl nach vier als auch nach acht Wochen nur basal exprimiert, was sich damit erklären lässt, dass *H. pylori* durch die spezielle Struktur seiner Flagellen einer Erkennung durch TLR5 entgehen kann (Sanders et al., 2006; Galkin et al., 2008). Allerdings ist die Bedeutung von TLR5 im Rahmen der Infektion mit *H. pylori* noch nicht genau geklärt, da im Gegensatz dazu in anderen Arbeiten dieser Toll-like Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von *H. pylori*-induzierten Signalwegen zu spielen scheint (Smith, Jr. et al., 2003). Zusammenfassend kam es also trotz einer durch die Immunisierung veränderten Immunantwort zu keinem Schutz vor einer Infektion mit *H. pylori*. Die durch die Immunisierung beobachtete gesteigerte Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 trug nicht zu einer Abschwächung der histopathologischen Veränderungen oder der Kolonisierungsdichte des Bakteriums bei. Trotz des



vorhandenen IL-10 kam es jedoch nur zu einer basalen Expression von IL-4. Somit handelte es sich bei der durch die Immunisierung ausgelöste Reaktion des Immunsystems trotz der Verwendung von CT um keine eindeutige Th2-Immunantwort. CT ist eigentlich ein klassisches Adjuvanz zur Induktion von antiinflammatorischen Immunreaktionen, doch durch die Verwendung in Kombination mit dem Th1-poloarisierenden Lysat konnte es trotzdem zu stark ausgeprägten Th1-Anworten kommen (Meyer et al., 2000). Obwohl manchmal auch eine Th2-geprägte Antwort favorisiert wurde (Blaser et al., 2001), würde eine reine Th2-Reaktion wahrscheinlich keinen ausreichenden Schutz vor einer Infektion mit *H. pylori* bieten. Die meisten Arbeiten empfehlen deshalb mittlerweile eine stark Th1-geprägte Reaktion des Immunsystems inklusive einer ausgeprägten aber kurzfristigen Gastritis, um einen Schutz vor *H. pylori* zu erreichen (Sawai et al., 1999; Roda et al., 2005; Shi et al., 2005). In Vakkzinierungsstudien mit IL-4 Knockout- und B-Zell-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass weder IL-4 noch die Produktion von Antikörpern für einen Schutz vor dem Bakterium nötig sind (Roda et al., 2005; Schroder et al., 2007). Außerdem wurde die protektive Funktion von IL-12, einem starken Th1-Zytokin bestätigt (Theiner et al., 2008). Wie diese Th1-geprägte Immunantwort genau aussieht und wie sie derart spezifisch induziert werden soll, ist dabei noch weitgehend unbekannt.

Sehr kritisch sind die in einigen Arbeiten beobachteten Zeiträume zu betrachten. Die von Jiang et al. für diesen Versuchsteil zugrunde gelegte Arbeit ging von einer sterilen Immunität gegen *H. pylori* aus (Jiang et al., 2003). Der untersuchte Zeitraum erstreckte sich allerdings nur über zwei Wochen. Zur Feststellung einer wirklichen Schutzfunktion vor dem Bakterium ist jedoch ein längerer Zeitraum erforderlich. Die meisten Versuchsansätze mit Gerbils erstreckten sich über mehrere Wochen und Monate, zur Analyse der Karzinogenese auch über Jahre (Gamboa-Dominguez et al., 2007; Tatematsu et al., 2007; Franco et al., 2008; Toyoda et al., 2008).

Die in dieser Arbeit bisher durchgeführten Immunisierungsstrategien konnten zwar veränderte Reaktionen des Immunsystems nach einer Infektion mit *H. pylori* hervorrufen, sie führten allerdings zu keiner protektiven Immunantwort. Deshalb kam im nächsten Versuchsteil ein neuartiger Immunisierungsansatz zum Einsatz,

der aktuelle Forschungserkenntnisse in Bezug auf die sehr wichtige Rolle von Dendritischen Zellen bei der Etablierung der Immunantwort mit einbeziehen sollte.

## **6.5 Modulation der *H. pylori*-induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit Dendritischen Zellen**

Dendritische Zellen (DCs) spielen bereits im frühen Infektionsverlauf eine wichtige Rolle. Nach der Aufnahme von Antigenen sekretieren sie Interferone und Zytokine, durch die wiederum andere Immunzellen beeinflusst werden. Sie leisten somit einen großen Beitrag zur Einleitung einer initialen Immunantwort. DCs präsentieren die prozessierten Antigene an ihrer Zelloberfläche, wodurch es nach Kontakt mit T-Helfer-Zellen zu einer Aktivierung dieser kommt. Auf diese Weise verknüpfen DCs sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort. Die Aufnahme von Antigenen ist also ein zentraler Bestandteil für die Funktionsweise von DCs. Dieser Vorgang kann auch *in vitro* durchgeführt werden und wird „Pulsen“ genannt. Durch den Transfer der manipulierten DCs zurück in den Wirt kann somit eine veränderte Immunantwort ausgelöst werden. Dies wurde bereits für eine Reihe von Tumorstimmungen, aber auch als Immunisierungsstrategie gegen Infektionserreger gezeigt (Remer et al., 2007; Yamaguchi et al., 2008; Sas et al., 2008; Connolly et al., 2008; Santin et al., 2008; Del Cacho et al., 2011; Boudreau et al., 2011).

Eine Infektion mit *H. pylori* führt bereits zu Beginn der Infektionsphase zu einer Th1-geprägten Reaktion des Immunsystems, die aber zu keiner protektiven Immunantwort führt. Durch den Einsatz von *in vitro* gepulsten DCs, also mit *H. pylori*-Antigenen inkubierten DCs, könnte diese Reaktion möglicherweise verändert werden und zu einer Eradikation des Bakteriums führen. Mithilfe des Gerbil-Tiermodells und den in dieser Arbeit etablierten Analysemethoden kann eine genaue Charakterisierung der Immunantwort erfolgen, und zusätzlich eine Korrelation mit den histopathologischen Veränderungen der Magenschleimhaut. Zunächst musste jedoch überprüft werden, ob die Gewinnung von DCs aus dem Gerbil durch die Verwendung von Maus-optimierten Versuchsprotokollen überhaupt möglich ist. Außerdem ist vor einem Einsatz im Tiermodell eine

phänotypische und molekulare Identifizierung und Charakterisierung der dadurch erhaltenen Zellen nötig, ebenso wie eine funktionelle Analyse.

#### **6.5.1 Herstellung und Charakterisierung von Dendritischen Zellen aus *Meriones unguiculatus***

In der überwiegenden Zahl der für das Tiermodell der Maus optimierten Versuchsprotokolle wird die Herstellung von DCs aus Knochenmark durchgeführt. Durch Inkubation der Knochenmarkzellen mit dem Wachstumsfaktor GM-CSF erhält man dann eine Kultur, die zum Großteil aus DCs besteht. Ein Pilotexperiment mit rekombinantem, kommerziell erhältlichem murinen GM-CSF verlief jedoch nicht erfolgreich. Gerbil GM-CSF weist im phylogenetischen Vergleich zu Maus GM-CSF nur eine Homologie von etwa 74% auf. Somit wurde die Herstellung von Gerbil-spezifischem GM-CSF nötig.

Als Expressionssystem wurden HEK293T Zellen ausgewählt, menschliche embryonale Nierenzellen, die nach einer Transfektion stabil Gerbil-GM-CSF exprimierten. Sie sekretierten das Protein in den Überstand und ermöglichten damit eine einfache und zuverlässige Herstellung von Gerbil-GM-CSF. Die Ausbeute ist zwar in eukaryotischen Zellen in der Regel geringer als in anderen Expressionssystemen, allerdings ausreichend für die geplanten Experimente. Außerdem kann im Gegensatz zu einer Expression in Prokaryoten wie *E. coli*, die Verunreinigung durch bakterielles LPS ausgeschlossen werden.

Ein sehr wichtiger Faktor bei der Herstellung von DCs ist, bei wie vielen der erhaltenen Zellen es sich überhaupt um DCs handelt. GM-CSF ist ein Wachstumsfaktor, der nicht spezifisch auf DCs wirkt, sondern auf eine Reihe von Zellen, wie z.B. Granulozyten und Makrophagen (Kruger et al., 2007). Mit keiner der bisher etablierten Methoden können hundertprozentig DCs generiert werden, der Anteil schwankt um etwa 50-90%, je nach verwendeter Methode (Zhang et al., 2002; Herrera et al., 2002; Jiang et al., 2008). Allerdings kann man mit einigen einfachen Maßnahmen das Wachstum von DCs positiv beeinflussen und das von unerwünschten Zellen unterdrücken. Durch die Verwendung einer geringen Konzentration von GM-CSF und einem kurzen Differenzierungszeitraum von sieben Tagen wird beispielsweise die Vermehrung von Granulozyten verringert. Das Wachstum von Fibroblasten kann auch damit nicht verhindert werden,

allerdings adhäreren diese Zellen sehr stark am Zellkulturgefäß und werden bei der Ernte der DCs nicht mit in die neue Kultur übernommen. Mit diesen einfachen Methoden wird ein hoher Reinheitsgrad der erhaltenen DCs ermöglicht. Um diesen genau zu überprüfen, wird in der Regel eine FACS-Analyse von charakteristischen Oberflächenmolekülen durchgeführt. Da zum damaligen Zeitpunkt keine Gerbil-spezifischen Antikörper erhältlich waren, wurde die Färbung mit Maus-Antikörpern durchgeführt, die jedoch aufgrund der ungenügenden Homologie zwischen den beiden Spezies nicht binden konnten. Somit mussten alternative Methoden für eine Charakterisierung der erhaltenen Gerbils-DCs gefunden werden.

Mithilfe der mikroskopischen Betrachtung der Zellen konnte der Entwicklungsverlauf beobachtet werden. Zytoplasmatische Fortsätze und die Bildung von Kolonien, beides typische Merkmale für DCs, konnten nur in mit GM-CSF behandelten Zellen beobachtet werden. Die Maturierung von DCs führt zu einer Reihe von Veränderung im Phänotyp der Zellen. Durch die Aufnahme von Antigenen kam es sowohl zu einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts, als auch zu einer Abnahme der Phagozytose- und Endozytosefähigkeit. Die molekulare Charakterisierung mit quantitativer TaqMan®-PCR ergab eine gesteigerte Expression der für DCs charakteristischen Oberflächenmoleküle CD11c, CD14, CD80, CD86 und CD83 (Koga et al., 2003; Guan et al., 2004; Luhr et al., 2004; Orabona et al., 2004). CD11c dient dabei nur zur groben Identifizierung von DCs (Adachi et al., 2002; Kassim et al., 2006). Die erhöhte Expression von CD14, CD80 und CD86 spricht für eine Maturierung der Zellen, insbesondere CD83 wird nur in ausgereiften DCs exprimiert (Prechtel et al., 2007a). Es wurde auch deutlich, dass lebender *H. pylori* zu einer geringeren Expression der CD-Oberflächenmoleküle führte als *E. coli*-LPS. Bei Betrachtung der RNA-Expression von Toll-like Rezeptoren ergab sich ein umgekehrtes Bild, hier führte das Bakterium meistens zu einer verstärkten Expression. In Bezug auf die RNA-Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen konnte, abgesehen von IL-6, kein Unterschied im Expressionsniveau zwischen LPS und *H. pylori* beobachtet werden. Ähnliches zeigte sich für die beiden Chemokine KC und Mip-2. Nur die Expression von iNOS konnte durch Inkubation mit dem Bakterium deutlich gesteigert werden.

Insgesamt ergab sich also ein für DCs aus der Literatur bekanntes Expressionsschema von Oberflächenmolekülen und Zytokinen (Kranzer et al., 2004; Kranzer et al., 2005). Interessant dabei war, dass lebender *H. pylori* zwar zu einer Maturierung von DCs führte, diese unterschied sich aber von der durch LPS induzierten in Bezug auf die Expression von fast allen untersuchten Oberflächenmolekülen, IL-6 und iNOS.

Nach der detaillierten Charakterisierung sollte die Funktionalität der erhaltenen Zellen analysiert werden. Sehr wichtig ist dabei die Stimulationsfähigkeit der DCs in Bezug auf T-Zellen. Da CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen die wichtigsten Immunzellen bei einer Infektion mit *H. pylori* darstellen, musste deren Interaktion mit den generierten DCs überprüft werden. Dazu wurde das Splenonzyten-Modellsystem benutzt, mit dem sich zelluläre Immunantworten untersuchen lassen (Deml et al., 2004). Die Milz setzt sich unter anderem aus T-Zellen zusammen und diese sollten nun zusammen mit den DCs inkubiert werden. Die DCs erhielten verschiedene Vorbehandlungen, so wie es für das spätere Immunisierungsexperiment geplant ist, d.h. auf der einen Seite ungepulst und auf der anderen Seite gepulst mit *H. pylori*-Lysat oder *H. pylori*-RNA. Die für die Splenonzyten-Kultur verwendeten Milzen stammten aus zwei Gerbil-Gruppen, die zuvor unterschiedlich behandelt wurden: Die eine Gruppe erhielt eine Immunisierung mit *H. pylori*-Lysat, die andere nur mit PBS. Ein Teil der Tiere hatte also bereits Kontakt mit den Antigenen, so dass es zu einer Restimulation der adaptiven Immunantwort kommt. Dies sollte sich in dem darauf folgenden *in vitro*-Versuch mit einer verstärkten T-Zell-Antwort äußern. Zur Analyse diente das für aktivierte T-Zellen charakteristische IFN- $\gamma$ . Das proinflammatorische Zytokin wurde nach Kontakt der DCs mit T-Zellen aus nicht-immunisierten Gerbils exprimiert. Im Vergleich dazu war die Expression des Zytokins nach Inkubation von DCs mit T-Zellen aus immunisierten Tieren, die dementsprechend bereits in Kontakt mit den Antigenen gekommen waren, stark erhöht. Das Pulsen der DCs mit *H. pylori*-Antigenen und eine Immunisierung der Gerbils mit Lysat führte also zu einer starken Expression von IFN- $\gamma$ . Die *in vitro* hergestellten und gepulsten DCs waren demnach in der Lage, T-Zellen zu stimulieren.

Zusammenfassend konnte durch das verwendete Versuchprotokoll eine große Anzahl an Gerbil-DCs generiert werden, die die charakteristischen Eigenschaften und Expressionsmerkmale von DCs trugen und *in vitro* zu einer Stimulation von

T-Zellen führten. Aufgrund dieser Basis sollte nun ein Immunisierungsexperiment mit DCs in Gerbils durchgeführt werden.

### **6.5.2 Modulation der *H. pylori*-induzierten Immunantwort durch Immunisierung mit Dendritischen Zellen**

DCs wurden für den nun folgenden Versuchsteil sowohl mit Antigenen gepulst als auch ungepulst verabreicht, um eventuell auftretende Reaktionen, die durch die alleinige Injektion der DCs auftreten, beobachten zu können. Das Pulsen der DCs erfolgte einerseits mit *H. pylori*-Lysat, da es durch seine heterogene Zusammensetzung zu einer starken Immunaktivierung führt (Morandi et al., 2011). Um eine bessere Präsentation der Antigene an DCs zu ermöglichen, wurde es zuvor mit Formalin fixiert (Kikuchi et al., 2004). Außerdem kam *H. pylori*-RNA zum Einsatz. RNA wurde bereits erfolgreich für Tumorstimmulierung verwendet (Jarnjak-Jankovic et al., 2007; Michiels et al., 2008). In der Arbeit von Bacci et al. wurden Maus-DCs mit RNA von *Candida albicans* transfiziert. Durch einen anschließenden Transfer der gepulsten DCs konnte in diesen Mäusen eine protektive Immunantwort auf eine kurz darauf folgende experimentelle Pilzinfektion erreicht werden (Bacci et al., 2002).

Die Produktion von *H. pylori*-spezifischem Immunglobulin G war in allen infizierten Gerbils signifikant erhöht, konnte jedoch durch die Verabreichung von Lysat-gepulsten DCs noch gesteigert werden. Mithilfe der Kombination aus unterschiedlichen Analysemethoden, wie Antikörpertiter und quantitativer PCR des Urease-Gens von *H. pylori*, konnten alle erfolgreich infizierten Gerbils identifiziert werden.

In allen nicht-infizierten Gerbils konnten keine histopathologischen Veränderungen der Magenschleimhaut beobachtet werden. Die mit *H. pylori* infizierten Gerbils wiesen eine ausgeprägte Infiltration von Entzündungszellen auf, auch Gewebedysplasie und Lymphfollikel kamen vereinzelt vor. Die Infiltration war jedoch auf die Lamina beschränkt und reichte nicht bis in die Tiefe des Bindegewebes der *Tela submucosa*. Die Ausprägung der histopathologischen Veränderungen war unabhängig von einer Injektion mit Lysat- oder RNA-gepulsten DCs.

Durch eine Infektion mit *H. pylori* kam es zu einer verstärkten RNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und TNF im Magengewebe. Die Injektion von RNA gepulsten DCs führte zusätzlich zu einer starken Expression von IL-6. Mit Lysat-gepulsten DCs konnte eine gesteigerte Expression von IL-6, aber auch IL-1 $\beta$  und MIF beobachtet werden. Die Verabreichung von gepulsten DCs, dabei vor allem Lysat-gepulste DCs, führte also in Gerbils zu einer gesteigerten Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen konnte keine erhöhte Expression der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 festgestellt werden. iNOS und KC wurden bei allen infizierten Tieren verstärkt exprimiert. Für TLRs konnte eine erhöhte Expression von TLR2 und TLR9 beobachtet werden, nicht jedoch von TLR4.

Insgesamt konnte durch die Verabreichung von Lysat- und RNA-gepulsten DCs die Expression von proinflammatorischen Zytokinen gesteigert werden, es zeigte sich jedoch keine Korrelation in Bezug auf die Ausprägung von histopathologischen Veränderungen der Magenschleimhaut.

Die hier verwendeten DCs wurden durch Inkubation von Gerbil-Knochenmarkszellen mit GM-CSF gewonnen. Die dadurch erhaltenen DCs myeloider Abstammung weisen eine hohe Expression immunologisch aktiver Oberflächenmoleküle wie z.B. MHC auf, im Gegensatz zu lymphoiden DCs (Szabolcs et al., 2003). Es wurden aus der Literatur bekannte Vorgehensweisen zur größtmöglichen Reinheit der DC-Kulturen angewendet, der exakte Anteil an DCs in der erhaltenen Zellsuspension konnte jedoch nicht genau bestimmt werden. Dies wäre nur durch eine Untersuchung der Oberflächenmoleküle mithilfe der FACS-Analyse möglich gewesen, die aber aufgrund fehlender Reagenzien für Gerbils nicht möglich war. In der Zellsuspension war demnach mit großer Wahrscheinlichkeit neben dem Hauptanteil an DCs auch ein weiterer Teil anderer Zellen enthalten, die zu einer Verunreinigung und damit möglicherweise verringerten oder veränderten Wirkung der DCs führen könnten. Das Pulsen der DCs stellt einen zentralen Bestandteil dieser Versuchsanordnung dar, es ist aber zugleich auch ein sehr kritischer Schritt. Die Aufnahme von Lysat scheint durch die Kombination mit Formalin gefördert zu werden (Harbour et al., 2008), eine Koinkubation scheint in diesem Fall ausreichend. Das Pulsen mit RNA erfordert jedoch andere Methoden, z.B. mithilfe einer liposomalen Transfektion (Bacci et al., 2002). Während bei kultivierten Zellen die Transfektionseffizienz meist sehr hoch

ist, kann diese bei primären Zellen stark schwanken (Gresch et al., 2004). Die Effizienz der RNA-Transfektion lag daher im Vergleich zu Lysat-gepulsten DCs wahrscheinlich deutlich darunter. Offenbar ist auch die Herkunft der DCs für den jeweiligen experimentellen Ansatz von Bedeutung. Während DCs myeloider Abstammung sich eher für Protein-basierte Ansätze eignen, weisen lymphoide DCs Vorteile bei der Verwendung in Kombination mit Nukleinsäuren auf (Servida et al., 2000). Das Pulsen mit einzelnen Proteinen, z.B. rekombinant exprimierten Pathogenitätsfaktoren, erwies sich bisher als wenig erfolgversprechend. Daher wurden die meisten bisher durchgeführten Experimente mit gepulsten DCs ebenfalls mit Lysat durchgeführt, wobei es sich in der Mehrzahl um Tumorlysate handelte (Bercovici et al., 2008; Grauer et al., 2008; Liu et al., 2008a). In diesem Versuchsansatz erfolgte der Zeitpunkt des Transfers der gepulsten DCs in die Gerbils jeweils zwei und eine Woche vor der Infektion mit *H. pylori*. Es sollte jedoch in Betracht gezogen werden, dass es zu diesem Zeitpunkt des Kontakts mit dem Bakterium eventuell bereits zum Abbau der zuvor injizierten DCs gekommen war. Für zukünftige DC-Transferexperimente sollten daher zuvor die auf den jeweiligen Versuchsansatz abgestimmten optimalen Transfer-Zeitpunkte bestimmt werden. Die intraperitoneale Verabreichung wurde in dieser Versuchsanordnung als erfolgversprechender Ansatz für die DC-Injektion angesehen, da hier eine gute Resorption ermöglicht wird und es in diesem Bereich zu einer Konzentration von APZ kommt. Die intravenöse Gabe scheint jedoch auch ein vielversprechender und möglicherweise sogar wirkungsvollerer Weg für die Verabreichung von DCs zu sein (Creusot et al., 2008).

Generell weisen die zum jetzigen Zeitpunkt in der Literatur verwendeten DC-Vakkzine nur geringe Immunogenität auf (Kalinski et al., 2009). Ob das an den zuvor genannten methodischen Problemen liegt, oder ob DCs generell nicht die erhoffte Rolle bei der Initialisierung einer Immunantwort gegen Tumorerkrankungen oder Infektionskrankheiten spielen, ist dabei noch nicht bekannt. Dennoch tragen auch die bisher erhaltenen Ergebnisse zu einer Vervollständigung des Gesamtbildes der Immunabwehr bei und eines Tages erhält man möglicherweise ein umfangreiches Werkzeug bei der Bekämpfung von Krebs- und Infektionskrankheiten.



## 6.6 Fazit

Die Etablierung des Gerbil-Tiermodells für die Infektion mit *H. pylori* bietet gegenüber dem Mausmodell einen entscheidenden Vorteil. Während man bei Mäusen aufgrund der breiten Verfügbarkeit von Reagenzien die immunologischen Vorgänge sehr gut analysieren kann, kam es zu nur mild oder moderat ausgeprägten histopathologischen Veränderung der Magenschleimhaut (Veldhuyzen van Zanten et al., 1994; Agarwal et al., 2008). Daher lässt sich keine Korrelation zwischen einer erfolgreichen Behandlung oder Immunisierungsstrategie, und den Auswirkungen im Magen herstellen. Im Gegensatz dazu erweisen sich Gerbils für die Analyse der *H. pylori*-Infektion als das ideale Tiermodell: Der experimentelle Aufwand ist im Vergleich zu Mäusen nur unwesentlich erhöht und es kommt bei diesen Tieren zu auffälligen histopathologischen Veränderungen der Magenschleimhaut (Hirayama et al., 1996b; Matsumoto et al., 1997; Takahashi et al., 1998; Ikeno et al., 1999; Maeda et al., 2007; Tsukamoto et al., 2007). Das Problem der bisher nicht ausreichend verfügbaren Reagenzien konnte in dieser Arbeit durch die Etablierung eines quantitativen TaqMan® PCR-Systems gelöst werden.

Die sichere Identifizierung von mit *H. pylori* infizierten Tieren ist nach einer experimentellen Infektion von grundlegender Bedeutung, daher wurden zwei Methoden mit komplett unterschiedlichem Ansatz kombiniert. Während durch die Bestimmung der Antikörpertiter nur ein Kontakt mit *H. pylori* nachgewiesen werden konnte, erfolgte durch eine PCR-Methode mithilfe des Urease-Gens ein direkter Nachweis der bakteriellen DNA. Durch die Kombination dieser zwei Methoden konnten *H. pylori*-Infektionen bei Gerbils zuverlässig nachgewiesen werden.

Eine Infektion mit *H. pylori* ruft eine Th1-geprägte Immunantwort hervor, die aber normalerweise zu keiner effektiven Eradikation des Bakteriums und einer (ohne Behandlung) lebenslang persistierenden Infektion führt. Eine Modulation dieser Immunantwort könnte daher eine verbesserte Reaktion des Immunsystems hervorrufen. ODNs sind aus der Literatur für ihre immunstimulatorische Wirkung bekannt, abhängig von der Nukleotid-Sequenz des jeweiligen ODNs. Während CpG-ODNs zu einer Th1-geprägten Reaktion des Immunsystems führen, können GpG-ODNs zu einer Verstärkung der TH2-Antwort beitragen (Ho et al., 2003; Sommer et al., 2004). Die Verabreichung von sowohl CpG- als auch GpG-ODNs

konnte im ersten experimentellen Abschnitt dieser Arbeit zur verstärkten Expression proinflammatorischer Zytokine im Magen beitragen, führte jedoch zu keiner Veränderung der histologischen Veränderungen in der Magenschleimhaut. In einem zweiten Versuchsteil sollte über einen längeren Zeitraum der Einfluss von immunmodulatorischen Adjuvanzen in Kombination mit einer Immunisierung auf eine Infektion mit *H. pylori* untersucht werden. Dazu wurden ein Th1-polarisierendes CpG-ODN und das für seine Th2-Immunantwort charakteristische CT verwendet. Während die Kombination aus *H. Pylori*-Lysat und CpG-ODN zu einer nur leicht verstärkten Expression von proinflammatorischen Zytokinen und vor allem Chemokinen führte, kam es mit einer Immunisierung bestehend aus *H. pylori*-Lysat und CT durch die Expression von IL-12 zu einer stark gesteigerten Th1-Immunantwort und auch zur Beteiligung einer regulatorischen Immunantwort mit Bildung von IL-10. Es konnte damit jedoch kein Schutz vor einer Infektion mit *H. pylori* korreliert werden, sondern im Gegenteil, es kam sogar zu stärker ausgeprägten histopathologischen Veränderungen als mit einer alleinigen *H. pylori*-Infektion. Es konnte eine starke Infiltration von Entzündungszellen in die tiefen Schichten des Bindegewebes des Magens beobachtet werden.

Immunisierungen mit DCs stellen durch ihre zentrale Rolle zu Beginn einer Immunreaktion einen vielversprechenden und neuartigen Vakkzinierungsansatz dar (Hou et al., 2011; Kapadia et al., 2011). Im dritten Versuchsteil dieser Arbeit konnte durch die Verabreichung von *H. pylori* Lysat- und vor allem von RNA-gepulsten DCs die Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Magengewebe gesteigert werden. Es zeigten sich jedoch unabhängig von der verwendeten Immunisierungsstrategie keine Abweichungen bei den *H. pylori*-induzierten histologischen Veränderungen in der Magenschleimhaut.

Die meisten bisher veröffentlichten Arbeiten im Zusammenhang mit Gerbils und einer Infektion mit *H. pylori* konzentrieren sich nur auf einen bestimmten Aspekt. Das kann z.B. die Untersuchung von Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* sein oder die Analyse von chemischen Substanzen auf den Verlauf der Infektion (Li et al., 2008; Wiedemann et al., 2009). Voraussetzung dafür ist aber ein detailliertes Verständnis vom Infektionsablauf und zuverlässige Methoden zur Auswertung. Mit der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmals eine detaillierte Charakterisierung des Immunprofils von Gerbils mit einer Vielzahl an immunologischen Parametern. Dieses konnte dann mit den histopathologischen Veränderungen korreliert

werden, die während einer Infektion mit *H. pylori* im Magen stattfinden. Außerdem wurde die Wirkungsweise unterschiedlicher Immunisierungsstrategien verdeutlicht. Dadurch wird ein besseres Verständnis für die Vorgänge im Immunsystem beim Ablauf einer Infektion mit *H. pylori* und der Modulation dieser durch immunstimulatorische Substanzen und Immunisierungen ermöglicht. Dieses Wissen kann für die weitere Entwicklung erfolgreicher Immunisierungsstrategien hilfreich sein.

## 7 Anhang

### 7.1 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

#### 7.1.1 Veröffentlichungen

Deml L, Aigner M, Decker J, Eckhardt A, Schutz C, Mittl PR, Barabas S, Denk S, Knoll G, Lehn N, Schneider-Brachert W.

**Characterization of the *Helicobacter pylori* cysteine-rich protein A as a T-helper cell type 1 polarizing agent.**

Infect Immun. 2005; 73(8):4732-42

#### In Bearbeitung

Denk S, Eckhardt A, Lehn N, Schneider-Brachert W

**Expression of gerbil GM-CSF and IL-4: morphologic and molecular effects on bone marrow cells from *Meriones unguiculatus***

#### Abstract

*Helicobacter pylori* causes a persistent infection in the stomach which cannot be cleared by the host immune system despite a strong inflammatory response. CD4<sup>+</sup> T-helper cells are known to be very important in *H. pylori* infection and dendritic cells, as the most competent antigen-presenting cells, may play a key role in this interaction. The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) has been shown to be a convenient animal model for studying *H. pylori* infection. In our work we used an established mouse protocol for generating gerbil dendritic cells *in vitro* and analyzed what kind of maturation is induced by LPS or living *H. pylori*. Different fluorescent assays displayed the change of dendritic cells from immature phagocytosing to mature antigen-presenting cells. Exact molecular characterisation revealed the up regulation of several surface antigen molecules like CD11c, CD14, CD80, CD83 and CD 86, but varying for maturation induced by LPS or *H. pylori*. The expression of toll-like receptors TLR2, 4, 5 and 9 was mainly increased only by stimulation with living *H. pylori*. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines IL-6, TNF, IL-12p40, IL-10, KC and Mip-2 could be significantly enhanced with LPS and bacteria. Interestingly *H. pylori* lead to strong expression of iNOS which might prove evidence that dendritic cells also have some kind of effector cell function. These data demonstrate that it is possible to generate immature dendritic cells from *Meriones unguiculatus* which change to mature DCs after incubation with LPS or living *H. pylori*.

### 7.1.2 Kurzbeiträge

Denk S, Lehn N, Hartmann A, Schneider-Brachert W

**Immunization with *H. pylori* lysate in combination with CpG-ODN and cholera toxin in the Mongolian Gerbil model of *H. pylori*-infection**

Int J Med Microbiol. 2007; 297S1:52

Denk S, Eckhardt A, Lehn N, Schneider-Brachert W

**Expression of recombinant GM-CSF and IL-4 and their effects on bone marrow cells from *Meriones unguiculatus***

Int J Med Microbiol. 2006; 296S3

Denk S, Röhl J, Klingel K, Sauter M, Bataille F, Lehn N, Schneider-Brachert W

**Impact of CpG versus GpG treatment on cytokine and chemokine response in *H. pylori*-infected Mongolian Gerbils**

Int J Med Microbiol. 2006; 296S3

Schneider-Brachert W, Denk S, Röhl J, Lehn N

**Influence of Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides with Different Immuno-Stimulatory Motives upon *Helicobacter pylori* Infection in the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*)**

Helicobacter. 2005; 10(5):547

### 7.1.3 Kongressbeiträge

#### Oktober 2007

#### **59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. (DGHM), Göttingen**

Poster:

- Immunization with *H. pylori* lysate in combination with CpG-ODN and cholera toxin in the Mongolian Gerbil model of *H. pylori*-infection

#### Oktober 2006

#### **58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. (DGHM), Würzburg**

Vortrag:

- Expression of recombinant GM-CSF and IL-4 and their effects on bone marrow cells from *Meriones unguiculatus*

Poster:

- Impact of CpG versus GpG treatment on cytokine and chemokine response in *H. pylori*-infected Mongolian Gerbils

#### Juli 2006

#### **7th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infections (HPI2006), Helsingør, Denmark**

Poster:

- Impact of CpG versus GpG treatment on cytokine and chemokine response in *H. pylori*-infected Mongolian Gerbils
- Activation of bone-marrow-derived dendritic cells from *Meriones unguiculatus* by *H. pylori* is differentially regulated by GM-CSF and IL-4

**April 2005**

**European Helicobacter Study Group, XVIII International Workshop,  
Copenhagen, Denmark**

Poster:

- Influence of phosphorothioate oligodeoxynucleotides with different immunostimulatory motives upon *H. pylori*-infection in the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*)

**März 2005**

**5. *Helicobacter pylori*-Workshop der Fachgruppen „Gastrointestinale Infektionen“ und „Mikrobielle Pathogenität“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Herrsching am Ammersee**

Vorträge:

- Immunization of mice with *H. pylori* lysate and restimulation of splenic cells *in vitro* results in an antigen-specific Th1 immune response
- Expression of gerbil GM-CSF and IL-4 and their effects on bone marrow cells from *Meriones unguiculatus*

## 7.2 Verzeichnisse

### 7.2.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die vielfältigen Wirkungen des Pathogenitätsfaktors VacA	14
Abbildung 2: Ablauf einer Infektion mit <i>Helicobacter pylori</i>	24
Abbildung 3: Interaktion einer Dendritischen Zelle (rot) mit einem Lymphozyt (grün)	30
Abbildung 4: Sequenzvergleich von IL-6 mit verschiedenen (Tier-)Arten zur Analyse homologer Abschnitte	60
Abbildung 5: Klonierung weitgehend unbekannter Sequenzabschnitte mithilfe einer kombinierten RACE-PCR	61
Abbildung 6: RNA-Expression von IL-6 im Gerbil-Tiermodell nach Stimulation mit CpG- oder GpG-Oligodeoxynukleotiden (ODNs)	64
Abbildung 7: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte Bildung spezifischer Antikörper	68
Abbildung 8: Struktureller Aufbau des Antrums im Säuger-Magen am Beispiel von <i>Meriones unguiculatus</i> (HE-Färbung)	71
Abbildung 9: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf <i>H. pylori</i> -induzierte Entzündungserscheinungen im Magen (HE-Färbung)	72
Abbildung 10: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von IFN- $\gamma$ im Magengewebe	75
Abbildung 11: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von IL-6 im Magengewebe	76
Abbildung 12: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von IL-1 $\beta$ im Magengewebe	77
Abbildung 13: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von TNF im Magengewebe	78
Abbildung 14: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von IL-18 im Magengewebe	79
Abbildung 15: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von MIF im Magengewebe	80
Abbildung 16: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von KC im Magengewebe	81
Abbildung 17: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von Mip-2 im Magengewebe	82
Abbildung 18: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von iNOS im Magengewebe	83
Abbildung 19: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von TLR4 im Magengewebe	84
Abbildung 20: Einfluss der Injektion von CpG- oder GpG-ODNs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von TLR9 im Magengewebe	85
Abbildung 21: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die <i>H. pylori</i> -induzierte Bildung spezifischer Antikörper nach vier und acht Wochen	91
Abbildung 22: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die Kolonisierungsdichte von <i>H. pylori</i> im Magen nach vier und acht Wochen	95
Abbildung 23: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf <i>H. pylori</i> -induzierte Entzündungserscheinungen im Magen nach vier und acht Wochen (HE-Färbung)	97
Abbildung 24: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Magengewebe nach vier Wochen Infektionsdauer	101
Abbildung 25: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von IL-10 im Magengewebe nach vier Wochen Infektionsdauer	106
Abbildung 26: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von Chemokinen und iNOS im Magengewebe nach vier Wochen Infektionsdauer	107



Abbildung 27: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von Toll-like Rezeptoren im Magengewebe nach vier Wochen Infektionsdauer	109
Abbildung 28: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Magengewebe nach acht Wochen Infektionsdauer	114
Abbildung 29: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von IL-10 im Magengewebe nach acht Wochen Infektionsdauer	118
Abbildung 30: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von Chemokinen und iNOS im Magengewebe nach acht Wochen Infektionsdauer	119
Abbildung 31: Einfluss der Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvanz-Kombinationen auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von Toll-like Rezeptoren im Magengewebe nach acht Wochen Infektionsdauer	121
Abbildung 32: Detektion der Proteinexpression mithilfe eines 6xHis-Tags durch Western Blot in (a) nicht-transfizierten und (b) mit Gerbil GM-CSF (17,7kDa) transfizierten HEK293T Zellen	127
Abbildung 33: Analyse der morphologischen Veränderung von Knochenmarkszellen nach sieben Tagen Wachstum (a) ohne oder (b) mit Zugabe von Gerbil GM-CSF	128
Abbildung 34: Färbung des Aktin-Zytoskeletts mit FITC-Phalloidin von (a) immaturren oder (b) maturateden Dendritischen Zellen	129
Abbildung 35: Phagozytose von GFP-exprimierendem <i>H. pylori</i> durch (a) immature oder (b) mature Dendritische Zellen	130
Abbildung 36: Endozytose von FITC-Dextran nach Inkubation der Dendritischen Zellen mit PBS, LPS und lebendem <i>H. pylori</i>	131
Abbildung 37: RNA-Expression von Oberflächenmolekülen	133
Abbildung 38: RNA-Expression von Toll-like Rezeptoren	134
Abbildung 39: RNA-Expression von Zytokinen	136
Abbildung 40: Expression von Chemokinen und iNOS	137
Abbildung 41: Stimulationsfähigkeit der Dendritischen Zellen <i>in vitro</i>	139
Abbildung 42: Einfluss der Immunisierung mit DCs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte Bildung spezifischer Antikörper	142
Abbildung 43: Einfluss der Immunisierung mit DCs auf <i>H. pylori</i> -induzierte Entzündungserscheinungen im Magen (HE-Färbung)	144
Abbildung 44: Einfluss der Immunisierung mit DCs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Magengewebe	146
Abbildung 45: Einfluss der Immunisierung mit DCs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von Chemokinen und iNOS im Magengewebe	150
Abbildung 46: Einfluss der Immunisierung mit DCs auf die <i>H. pylori</i> -induzierte RNA-Expression von TLRs im Magengewebe	152
Abbildung 47: Ablauf einer Infektion mit <i>H. pylori</i> und Aktivierung der verschiedenen Immunzellen	165

### 7.2.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer zum Nachweis des <i>H. pylori</i> Urease-Gens	47
Tabelle 2: TaqMan® Primer und Sonden	51
Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Lösungen und	54
Tabelle 4: Verwendetes Material	54
Tabelle 5: PCR-Nachweis von <i>H. pylori</i> -DNA im Magengewebe	70
Tabelle 6: Übersicht RNA-Expressionsprofil des Magens	87
Tabelle 7: PCR-Nachweis von <i>H. pylori</i> -DNA im Magengewebe nach vier Wochen Infektionsdauer	93
Tabelle 8: PCR-Nachweis von <i>H. pylori</i> -DNA im Magengewebe nach acht Wochen Infektionsdauer	93
Tabelle 9: Übersicht RNA-Expressionsprofil des Magens nach vier Wochen Infektionsdauer	112
Tabelle 10: Übersicht RNA-Expressionsprofil des Magens nach acht Wochen Infektionsdauer	124
Tabelle 11: PCR-Nachweis von <i>H. pylori</i> -DNA im Magengewebe	143
Tabelle 12: Übersicht RNA-Expressionsprofil des Magens	154

### 7.3 Nukleotid-Sequenzen von *Meriones unguiculatus*

#### cDNA (Teil-)Sequenzen von *Meriones unguiculatus*:

**CD11c**

CAGATCGGCTCCTACTTTGGGGCGTCCCTCTGTTCTGTGGACATGGATGGAGATGGCAGCAC  
TGACCTGGTCCTGATCGGTGCCCCCATTAACGAGGCGAGACCCGAGGGGGGCAGGTGTCC  
GTGTGCCCCATGCCCACTGGGAGGGGCAAGTGGCAGTGTAAAGGCCACTCTCCACGGGGAGC  
AGGGCCATCCCTGGGGCTGCTTTGGGGC

**CD14**

GACAAGGGATGCTTGGCTTGCAGAACTGCAACAGTGGCTAAAGCCTGGACTCAAATACTGC  
ATATTGCCAGGCACACTCGCTCAACCTTTCTGCGAGCGGGTCCGTGTCTTCCCTGCCCTT  
GCCACCTTAGACCTGTCTGACAACCCCGAATTGGGCGAGAGAGGACTGATCTCCGCTCTCTG  
TCCCAACAAGTTTCCGGCACTCCAAGTTTTAGCACTGCGCAACGCCGGGATGGAGACGCTCA  
GCGGCGTGTGCTCTGCGCTGAGCGCAGCGAAGGTACAGCCGCAGGAAGTGGACCTTAGTCA  
CAATCACTGAGGGATACTACAGGCGCTCCGAGGTGTGACTGGCCCAGCTCGCTAAACTCTC  
TCAATCTGTCTTTCACTGAGCTGGAGCAG

**CD80**

ATGGGTTACCGACTGATGCAGGACTCACCACCCCTCAGGTCTCCGCCTCTCAGGCTCATTCA  
CTCTTTGTGCTGCTGGTTGCTCTCTTTGCAATGTCTTCAGGTATTGGCCAAAGTGTTCAGTCG  
GTGAATGAAAAGGTTTCATTGTCCTGTGGTTACAACCTTTCTTTGATGAGCTGGCCATACACC  
GAATCTACTGGCAAAAAGATGACAGAAAGATGGTGCTGAGCATCAGCTCTGGAGATAAGAAAG  
TGTGGCCGGAGTATCAGAACCGGACTTTATGTGACATCAGTAACAACCTTCTCGCTCATGATCC  
TGGGCCTGCTCCCTCAGACAGGGGCACTTACGAATGCGTCGTTCAAAGAAAGAGAGAGGG  
GTTTATCTCCTGAGACACTTGAATTCTGTGGAGCTGTCCATCAGAGCTGACTTCCCTGTCCCT  
AATATAACTCAGTTTGGAAATCAATCTGCCGACATGAAAACGATAATCTGCGAAACCTCTGGAG  
GTTTCCCAGAGCCTCGCCTCTCTTGGTTGGAAAGTGGAAGAGAATTAAGGGGCATCAATACAA  
CCGTTTCCCAGGACCCTGAATCTGAACTGTATGCCGTCAGTAGCAAACCTGGATTTCAATGCGA  
CCTACAACCGAAGCATTGTGTGTTCCGTCGCCTATGGCAAATTTGAAGTGTGGAAGAACTTCA  
CCTGGAAAAAACCCCAAGACACCTCCTGATAGAAAGAACACAACCTTGGATTACTACAAATG  
TGGCAGTTTCAATATTACCAGCAATAGCAACAGGAATAGCAATATTACTAATAATCTTTGCAGT  
GTACTGTAAGTACTACTTTTATAATCATCATCAATTCCTGGAAGTCAGACCCCACTAG

**CD83**

GACAAGGGATGCTTGGCTTGCAGAACTGCAACAGTGGCTAAAGCCTGGACTCAAATACTGC  
ATATTGTCCAGGCACACTCGCTCAACCTTTCTGCGAGCGGGTCCGTGTCTTCCCTGCCCTTG  
CCACCTTAGACCTGTCTGACAACCCCGAATTGGGCGAGAGAGGACTGATCTCCGCTCTCTGT  
CCCAACAAGTTTCCGGCACTCCAAGTTTTAGCACTGCGCAACGCCGGGATGGAGACGCTCAG  
CGGCGTGTGCTCTGCACTGAGCGCAGCGAAGGTACAGCCGCAGGAAGTGGACCTTAGTCAC  
AATCACTGAGGGATACTACAGGCGCTCCGAGGTGTGACTGGCCCAGCTCGCTAAACTCTCT  
CAATCTGTCTTTCACTGAGCTGGAGCAGGTA

**CD86 (GenBank AY095931)**

ATGGATCCCAGACGCATCATGGAATTGGGAATCCTTCTGCTAGTGACGGCCTTCACGCTCTCA  
GGCGCTGCTTCCATGAAGATACAAGCTTATTTCAATAGCACTGCATGCCTGCCGTGCCACAT  
TCAAAGGTTTCAAGACATGAGCCTGAGCGAGCTGGTCGTATTCTGGCAGGACCAGAAAAAGCT  
GGTTCTGTATGAGCACTATCTGGGCAGAGAGAAATCTAATAGCGTAAATGCCAAGTACCTTGG  
CCGCACGAGCTTCGATGAGCATAACTGGGCTTTACGGCTTCCCAACGTTCCAGATCACAGACAT  
GGGCTCATATGCTATATCCAACAAAACGACCCACGGGATCCGTCATCCTCCAGCAGAC  
AAACATGGAGCTGTGCGTGGTCTGCTAACTTCAGTGAGCCTGAAATAGAGCTGGCTCAGAAATG  
TAACGAGAAATTCTGGCATAAAATTTGACCTGCACATCCGAGCATGGTTTTCCAAAACCTATGAA  
GATGTATTTTTTATCATTAACCTCACTAATAAGCAAGGCGACGACATGGAGATATCACAAGAC  
AACGTCACAGAACTATTCAGCGTCTCCACCAGCCTGTGCTCCCGTTCCAGAGGACGCGTA  
CAATGTGACTTTCTGGTGTGTTCTGGAAACCAAGTCGATGAATATTTCTCCAGACCCTTCAGC

GTAGTTCTTCCAGAGCCCCGACCTGTTCAAGAGAACTGGAGAGTCACGGTTGTTGTCGCGGT  
TGTGTTGCTGTCTCGGCGCGGTTCTTCTCTGATCATCTATTTCTATGTAGCTGCTGGTC  
GAGGCGAAAAGATGCCAGAAGAAGCAGGAGCCGCGTGGCATCTGTCTCTTAG

**HPRT (GenBank L37778)**

ATGGCGACCCGCAGTCCCAGCATCGTGATTGGCGATGATGAACCAGGCTATGACCTGGATTT  
ATTTTGTATACCTAAACATTATGCCGAGGATTTGGAGAAAGTGTTTATTCCTCATGGACTGATT  
ATGGACAGGACTGAAAGACTTGCTCGAGATGTCATGAAAGAGATGGGAGGCCATCACATTGT  
GGCCCTCTGTGTGCTCAAGGGGGGCTATAAATTCTTTGCTGACCTACTGGATTACATTAAATC  
ACTGAATAGAAATACTGATAGATCCATTCTATGACTGTAGATTTTATAAGATTGAAGAGCTATT  
GTAATGATCAGTCAACAGGGGACATAAAAGTTATTGGTGGAGATGATCTCTCAGCTTTAACTG  
GAAAGAATGTCTTGATTGTTGAAGATATAATTGACACTGGTAAAACAATGCAAACCTTTGCTTTC  
CTTGGTCCAGAAGTACAGTCCCAAAATGGTTAAGGTTGCAAGCTTGCTGGTGAAAAGGACCCC  
TCGAAGTGTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTGGATTTGAAATTCCAGACAAGTTTGTTGTTGGA  
TATGCCCTTGACTATAATGAGTACTTCAGGGATTTGAATCATGTTTGTGTCTTAGCGAAAGTG  
GAAAAGCCAAATACAAAGCCTAA

**IFN- $\gamma$  (GenBank L37782)**

TGAACGCTACACACTGCATCTTGGCTTTCAGCTCTGCCTCCTGGCGATTTCTGGCTGCAGTA  
GTCAGGTCCCAATCATTGAAGAAATAGAAAATCTGAAGAGATATTTCAACTCAAGTAACTCAGC  
TGTGGGGGATAGTAAGGACGTTGTTTTACATGTCTTGAGGAAGTGGCAAGAGGATGGCGACA  
CAAAAGTAATTGATGTCCAGATTGTCTCTTTCTACTTCAAACCTCTTTGAAGCCTTGAAAGGCAA  
CCAAGCCATTGAGAAGAGCATAAACGCCATCAGGGCAGATCTAATCGCTAACTTCTTTAAACAA  
CAGTGAAGCGAAATACGATGGGTTTCATGAGCATCATGAAGATTGAGGTAAATGATCCACAGAT  
CCAGAGCAAAGCTATCAATGAACTTGTCAAAGTAATGGGCCATCTGTCACCCAGAGTCACCCCT  
AAGGAAGCGGAAAAGGAGTCGGTGCTGCTTCGGAGGTGGCAATCGTCTAAATAAGAACAATC  
CTGCCAGCACTATTTGA

**IL-6**

ATGAAGTTTCTCTCCGCAAGAGACTTCCAAGCACTTGCCTTCTTGGGGCTGATGGTGGTGATG  
GCCACTGCCTTCCCTACTTCACAAGTCCGGAGAGGAGACTTCACAGAGGACACCACCCCAA  
CAGACCAGTATACACCACTTCACAACAAGTCAGAGGCCTGATTACATATGTTCTCAGTGAAATC  
TTGGAAACGAGAAAACAGTTGTGTAATGACAATCCTGACTGTATGAACAAGGAAAATGCATTGT  
CAGAAAACAATCTGAAACTTCCAGAGATACAGAGAGATGATGGATGCTTCCATACTGGATACA  
ATCGGGACGTTTGCCTATTGAAAATCACCTCTGGTCTTCTGGAGTACCAGACATATCTGGAGT  
ATGTGAAGAACAACCTTACAAGATAACAAGAAAGACAAAGCCAGAGCCATTCAGAGCAACACCA  
AAACCCTAATTCGTATCTTCAAACAAGAGGTGAAGGATCCAGGTCAAATAGTCTTTCCTGACCC  
AACTTCCGAGGCGCTCCTACTGGAGAACTGGAGTCACAGACGGAATGGCTGAAGTCCAAGA  
CCACCCAGCTCATCCTGACAGCACTTGAAGAATTCCTCAAGGTCACCAAGAGGTTACTTTGC  
AAAACCTAG

**IL-1 $\beta$** 

ATGGCAACCGTTCCTGAACTCAGCAGTGAAATGACAGCTTTCCACAGTGATGAGAACGAGCTG  
TTCTTTGAGGTTGACAGACCCCAAAAGATGAAGGGCTGCTTCCAAGACCTGGACCTGGGCTG  
TCCAGATGAGAGCATCCAGCTTCAGATCTCCAGCAGCATTTCAACAAGAGCTTCCGGCAGGT  
GGTATCGCTCATCGTGGCTGTGGAGAAGCTGTGGGGCATGCCTGTCTCTTGCCCGTGGACCT  
TCCAGGATGAGGACCTGAAAACCTTCTTTTCTTCATCTTTGAAGAAGAGCCATCCTCTGTGA  
CTCGTGGAAGACGAGCAGTTGGTGTGTGATTTTCCATTGACAGCTGCACTGCAGGCTCC  
GGGATGAGCAACAAAAGTGCTCTGTCTGTCTGACCCACATGAGCTGAAAGCGCTCCACCTC  
AATGGAGAGAATATAAACCAACAAGTGTTTTCTCCATGAGCTTTGTACACGGTGACACAAGC  
AGCAACAAAATACCGGTGGCCTTGGGCCTCAAGGGAAAGAATCTGTACCTGTCTGTGTGAT  
GAAAGACGGCAGGCCACCCCTGCAGCTGGAGAGCGTGGACCCCAACAATACCCGAAAAAG  
AAGATGGAAAAGCGGTTTGTCTTCAACAAGATAGAAGTCAAATCCAAGGTGGAATTCAGTCT  
GCACAGTTCCCAACTGGTACATCAGCACCTCCCAAGCAGAACATAAACCTGTCTTCTCTGGG  
AGCAACAGTGGGCAGGATATAGTTGACTTCACCTTGAATCCGTCTCTTCTCTAA

**TNF**

ATGAGCAGAGAGAGCATGATCAACGACATCGAGCTGGCGGAGGAGGCGCTCCCCCAGAAGT  
CGGCGGGGCGCCAGGGCTCCAGGCGCTGCCTGTGCCTCAGCCTCTTCTCTTTCTGCTCGT  
GGCGGGGGCCACCACGCTCTTCTGTCTCCTGAACTTCGGGGTGATTGGCCCCCAAAGGGAA  
GAGAAGTTCCCAAACGGCCTCCCCATCATCAGCTCCATGGCCCAGACCCTCACACTCAGGTC  
CTCTTCTCAGAACGCCAGCGACAAGCCTGTGGCCCATGTCTAGCCAACCACCAAGTGGAGG  
AGCAGCTGGAGTGGCTGAGCCGGCGTGCCAACGCCCTCCTGGCCAACGGCATGGAGCTCAG  
GGACAACCAGCTGGTGGTGCCATCGGACGGGCTGTACCTCGTGTACTCCCAGGCCCTCTTCA  
AGGGGCAAGGCTGCCCCCACCTCGTGCTCCTCACGCACACCGTCAGCCGCTTCGCTGTCTC  
CTACCAGGACAAGGTCAGCCTCCTGTCTGCCATCAAGAGCCCCTGCCCCAGGGACGCACCC  
GAGGGGGCCGAGCCCCGAGCCCTGGTACGAGCCCATCTACCTGGGCGGGGTCTTCCAGCTG  
GAGAAGGGAGACCGACTCAGCGCCGAGGTCAACCTGCCCCAGTACTTAGACTTCGCCGAAC  
CCGGGCAGGTCTACTTTGGAGTCATCGCTCTGTGA

**IL-12p35 (GenBank AF288849)**

ATGCGTCAGTCACGCCGCCTCTTCTTTTTGGTCACCCTTGTCTAATCCACCTCAGTTTGGCC  
AGAGCCAAGCCGGTCTCCGGACCCGCCCGGTGTCTTAACAGCTCCCAAACCCTGCTCAGGAC  
TACGGACAACGCGCTGAAGACGGCCAGACAAAAGCTAACTAACTACTGTGGTGCTGAAGACT  
TCGATCGCGAAGACATCACAAAAGACAAAACCAGCACACTGAAGGCCTGTTTACCACTGGAAC  
TGGTCAAGAATGAGAGTTGCCTGGCTGGAGAGACTTCTTCCATGATCAGAGGGGAGCTGCTG  
CTTCCCCAAAAGACTTCTTCCATGATGACCCTGTGCCTTAGTAGCATCTATGAGGACTTGAAG  
ATTTACCAGACAGAGTTCCAGGCCATAGACGCAGAGCTTCGGCGTCAGAATCAGATCACTCTG  
GACAAGGACATGTTGGCAGCCATTGATGAGCTGATGCAGGCTCTGAATCATAATGGGCAGAC  
TGTGCCCCGGAACCTTACCTGGCAGAAAAGAGACCCTATCAAATTGGAAATGCATCTCTGCAT  
TCAACTCCATGCTTTCAGCATCCGAGTCACGACCATCAACAAAGTGATGAGCTATCTGAACTC  
CTCCTGA

**IL-12p40**

ATGTGTCATCAGAAGCTAACCATCTCCTGGTTTGCTGTGGTTCTGCTGGCATCTCCACTTATG  
GCCATATGGGAGCTGGAGAAAAATGTTTATGTTGTAGAGATGGACTGGAGGAGCGGTGCGAA  
TGAAAGCGTGGTCCTCACCTGTGACACTTCTGAAGAGGGTGATATCACCTGGACCAAAGACC  
AGACGACCAAAGTAGAGCAATCTGGA AAAACCGTGACCATCGAAGTCAAAGACTTCAATGAAG  
CTGGTCAATATACCTGCCACAAAGGAGACCAGACCCTCAGCCACTTCCGTCTGCTGCTCCACA  
AGAAGAAAAACGGATATTGGTCCAATGAGATCTTAAAGCAGGATAAAAAATTCCGAAAATCAGA  
CTTTCCTGAAATGTGAGGCAGCAAATTA CTCCGGGCGTTTCACGTGCTCTTGGCTGGTGGAAA  
GGACTGACTTGAAGTTCAGCATCAAGAACAGCAGTAGTTCCTCTGACTCCCGAGCAGTGACG  
TGTGGAGCTGTGTCTCTGACCGCAGAGAAAGTCAAAGGGGATGAAAAGGATGGTAAGCTTAA  
GCAGTACTCAGTGACGTGCCAGGAGGACATCACCTGCCCAACTGCAGAGGAGACTGTGCCCA  
TTGGCCTGGTGTGCTGGAGGCACAGGAGCAGAATAAATATGAGAACTACAGCACCAGCTTCTTC  
ATCAGAGACATCATCACACCGGACCCTCCCAAGAACCTGAAGGTGAAACCTTTGAAGAACGAT  
AAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACTCCTGGAGCACCCCCCATTCCTACTTCGCCCT  
CAAGTTCTGTGTTTGACCGAGAGCAATAAAGAAAATAAGATGAGGAACACAAATAGCAATAA  
AGAAAATAAGATGAGGAACGCATGTATACAGAATGGCACATGGCTAGTAGACACGACCTCCAC  
CAAAGTCCGGTGCAAAGATGGAAGAGTCTGCGTGGAGGCTCAGGATCGCTACTACAATTCTTT  
GTATAGCAAACATGCGTGCGTGCCCTGCAAAATAG

**IL-18 (GenBank AY095932)**

ATGATGGCTGCCACACCAGAAGAAGGCTCTTGATCAACTTCAAGGAAATAATGTTTATTGAC  
AACACACTTTACTTTATACCTGAAGATAATGGAGACCTGGAATCAGACAGCTTTGGCAGGCTTA  
GCTCTACAGCCACGGTGATACGAAATATAAATGAGCAAGTTCTCTTCGTTGACAGAGGAAAAC  
AGCCAGTGTGTTGAGGACATGACTGATGCGGAACAAGAGGCTAATGGACCCCAGACCAGACTG  
ATAATATATATGTATAAGGATACTGAAGCAAGGGGGCTGGCTGTAACCCTCTCTGTGAAGGAT  
ACAACAATGGCTACCCTCTCCTGTAAGAACAAAATCATTTCTTTGAGGAAATGAATCCACCTG  
AAAATATTGATGATACAGAAAGTGATCTCATATTCTTTAGAAACGTGTTCCAGGACACAATAA  
GATGCAATTTGAATCTTCACTGTACAAAGGGCACTTTCTAGCTTGCCAAAAGGAGGAAGACGC  
TTTCAAACCTCATCTTGAAAAAAAAGGATGAAAATGGGGATAAATCTGTAATGTTCACTGTTACA  
CCCTTACATCAAAGTTAA

**MIF (GenBank AF045740)**

ATGCCTATGTTTCATCGTGAACACCAACGTTCCCCGCTCCTCCGTGCCAGAGGGGCTTCTCTCT  
GAGCTCACCCAGCAGCTGGCGCAGGCCACCGGCAAGCCGGCACAGTACATCGCAGTGCACG

TGGTCCCGGACCAGCTCATGACTTTTCAGCGGCTCGAGCGACCCCTGTGCCCTCTGCAGCCTG  
CACAGCATCGGCAAGATCGGCGGGCGCCAGAACCGCACCTACAGCAAGCTGCTCTGCGGCC  
TGCTTGCCGATCGCCTGCGCATCAGCCGGACCGGATCTACATCAACTATTACGACATGAAC  
GCAGCCAACGTGGGCTGGAACGGTTCACCTTCGCTTGA

**IL-4 (GenBank L37779)**

ATGGGTCTCAGCCCCCAGCTAGCTGCTGTCCTGCTCTGCCTTCTAGTGTGTACCGGGAAGTAT  
GCTCGCAGACAGGACAGAGAGGAGGCTTGAGAGAGATCATCCACAATTTGGACCAGGTCTT  
AAAGAAAGAGACACCATGCACGGAGATGTTTGTGCCAGATGTCCTCATAGCAACGAAGAACAC  
CACAGAGAAGGGACTCCTCTGCAGAGCTACCAGGGTGCTCCGCAAATTTTACTTCCCACGAG  
AGGTGACTCCATGCTTGAAGAACAACCTCCGGGGTCTCAGCATCTTGAGAAAACTCTGTGCGA  
GCATCAGTACCCTGCATCCACAGGAAAGCTGTAGTGTGAGCACGCCACACTCACGACGCTG  
AATGACTTCCTGGGACGCCTAAGAGGGATCATGCAGATGAAAACTGGCAGGGTTGA

**IL-10 (GenBank L37781)**

ATGCCCAGCTCGGCACTGCTATATTGCCTAATCTTACTGGCTGGAGTCCGGGCCAGCAGAGG  
CGAGTACCCCCGGAATGAGAGTAACTGCACCCACTTCCCAGTCAGCCAGACCCACATGCTCC  
GAGAGCTTCGAGCTGCCTTCAGCCAGGTGAAGACTTTCTTTCAAAGAAGGACCAGTTGGACA  
ACATACTGTTAACGGATTTCCTTGCAGCAGGACTTTAAGGGTTACTTGGGTTGCCAAGCCTTAT  
CAGAATGATCCAGTTTTACCTGGTAGAAGTGATGCCCCAGGCAGAGAACCACGGCCAGAA  
ATCAAGGAGAAGTGAAGTCCCTGGGAGAGAAAGTTGAAGACCCTCAGAATGCAGCTGCGGCG  
CTGTCATCGATTTCTCCCTGTGAAAATAAGAGCAAGGCTGTGGAACAGGTGAAGAATGATTT  
TAATAAGCTCCAAGAGAAAGGTGTCTACAAGGCCATGAATGAATTTGACATCTTCATCAACTGC  
ATAGAAGCATACATGACAATCAAAATGAAAAGCTGA

**iNOS (GenBank AB044782)**

GGAAGTGGGCAGGAGGATGGGCCTGGAGACCCACACACTGGCCTCCCTTTGGAAAGACCGG  
GCTGTCACGGAGATCAATGTGGCTGTGCTCCACAGTTTCCAGAAGCAGAATGTGACCATCATG  
GACCACCACACAGCTTCGGAGTCCTTCATGAAGCACATGCAGAATGAGTACCGGGCCCGAGG  
AGGCTGCCCTGCAGACTGGATTTGGCTGGTCCCCCAGTGTCCGGGAGCATCACCCCTGTGT  
TCCACCAGGAGATGCTCAACTACGTTCTGTCTCCATTCTACTACTATCAGATCGAGCCCTGGA  
AGACCCATGTCTGGCAGGATGGGACGCTGAGGCCAGGAGGAGAGAAATCCGTTTTAGAGT  
CTTGGTGAAAGTGGTGTCTTTGCTTCCGTGCTGATGCGCAAGGTCATGGCTTCCCGGGTCA  
GAGCCACAGTCCTCTTTGCTACTGAGACAGGAAAGTCTGAAGCTCTAGCCCAGGACCTGGCA  
GCCTTGTTTCAGCTAT

**KC**

CATCGCAGGGATTACCCCCAAGAGCATCCAGAGCTTGAAGGTGACGCCTCCAGGACCCCACT  
GCACCCAGACCGAAGTCATAGCCACTCTCAAGAATGGTCGCGAAGCTTGCCTAAACCCTGAA  
GCCCCATGGTTCAGAAGCTTGTCCAAAAGATACTAAAGAAGGGCATCTCCAAGTGA

**Mip-2**

GAGGAGCCTGCAAAGGATTAGGTTTGAGGACGTGCAGAGCTTGACCGTGACCTCCCCGGGA  
CCCCACTGCACCCAGACTGAAGTCATAGCCACTCTCAAGAACGGTCAGGAAGTCTGTCTCAA  
CCCCGAAAGCCCTCGGCTTCAGAAAATCATCCGAAAGATCCTGAAGATGAAAGCAGCGGCTA  
CAGCTGAGCCTGGTAAGGAGGAAGCCCTTGA

**TLR2**

GTGTTCTGTGCTTTCTGAGAACTTTGTGCGGAGCGATTGGTGCAAATACGAACTGGACTTCTCC  
CACTTCAGGCTCTTCGAAGAGAACAATGACGCCACCATCCTCGTTTTGCTGGAGCCCATAGAG  
AAGAAAGCCATCCCCAGCGCTTCTGCAAACCTGCGCAAGATAATGAATACCAAGACCTACCTG  
GAGTGGCCCTTAGATGCCGCTCAGCAGGAAGTGTTCTGGGCAAATCTGAGAACTGCAATAAA  
GTCGTAG

**TLR4**

AAGACAACACACTTTCAAATGTCTTCACAATTACAACAACTTGACATTCTGATCTTTCTAAA  
TGCCAGTTGCAACGTGTGTCTTGGGGTGTGTTTGACAACTCAGTAGACTTCAGTTACTGAAT  
ATGAGTCACAACAACCTACTGATTTTGGACCCATTCCATTATAAACAGCTGTACTCCCTGAAGA  
CTCTGGATTGCAGTTTCAATCGCATAGAGACAGCCAAAGGAATTCTGCAACATTTTCAAATAG  
CCTAACCTTCTTAAATCTTACTAATAATTCTCTGGCTTGACATGTGAACATCAGAACTTCTGCG  
AGTGGGTCAAGGACCAGAGGATGCTCTTGGTGAATGCTGAACAAATGAAATGTGCAACACCT

GTAGACCTGAAGGACTCCCTGGTGTGGATTTTAGGAATGCTACATGTTATATGCACAAGACT  
ATCATCACTGTGTGAGTGATGAGTGTGCTTGTGGTGACCACTATAGCATTTCTGATCTACAAAT  
TCTATTTTACCTGGTACTTATTGCTGGCTGTAAAAAGTACAACAGAGGTGAAAGCATCTATGA  
TGCCTTTGTCATCTATTCAAGCCAGAATGAGGACTGGGTGAGAAATGAGCTGTAAAGAATTGA  
GAAGAAGG

**TLR5**

TCTGATGGTCTCATGTCTCATCAGCTGATACTGTGACAGGGACCCCATCACCACCACGATGAG  
TACAGTCTTGAGCTCAGACAGACACCGGCTCTGGGCGTACCTGAAGGCTTCCAGGCACCAGC  
CATCCTTGAGGAAGTGCCTGCTCACTAGACACACTATCTTCCTGCTGCCCCAGACAGCCGCCT  
GAATGTTGGAGATATGGTTTTCCCCTGGGATGAAGTCCCTTTCTTCAAAGCACAGCCTGAGCC  
TGTTTTGGGAACTGTAAGTGAACATCCAGGTATTTGAGCAAAGCATTCTGTGCCCATTCAAAAGTC  
TTATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGGCGGTACCAGCTTTTGTTCCCTTT  
AGTGAGGGTTAATTTTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTA  
TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCT  
AATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACC  
TGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGG  
GCGCTCTTCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCG  
GTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTA

**TLR9**

AGCCTTTGGGCCTGGTGGACTGTGATTGGCTGTTTCCTGAAGTCTGTGCCTCACTTCTTGGCAA  
CAGATCTCCTTTCCAACGTCACCAACCTTTCTTGGTCTCCAACCGTATCCACCACCTGCACG  
ACACCGACTTCATCCACTTGCCCAAACTGCTGCATCTGAACCTCAAATGGAAGTGTCTCCCA  
TCGGCCTCAGCCCCATGCACTTCCCTTGCCACATGACCATTGAGCGCCACACCTTCCTGAAC  
GTGCCTAAGCTGGAAGAGCTGAACCTGAGCAACAACGGCATCACCCTGTGCCCCCACTGCC  
CAGCTCCCTGAAGAAGCTAAGCCTGAGTCACACCAACATCCTGGTACTACATTTTAGCAGCTT  
TGGTTTCCCGAGCTCCCTGCAATTTCTCTTCATGGATGGAAACTGCTACTACAAGAACCCCTG  
CAGCAAGGCAGTAGAGGTGGCCCCGGGTGCCCTTCTGGGCTTGAGCAATCTCACCCATTTGT  
CACTCAAGTATAACAACCTCACGGAGGTGCCCCGCCAACTGCCCCCAGCCTGGAGTACCTT  
CTGGTGTCTATAACCACATTGTCAAGCTGGGGCCTGAAGACCTAGCCAATCTGACGTCCCTT  
CGAGTGCTTGATGTGGGCGGGAATTGTCGCCGCTGTGACCACGCCATCAACCCTTGTATAGA  
CTGTAGACAGAAGTACCTCCAGCTGCAACCTGACACCTTCATCACCTGACCCACCT

## 8 Literaturverzeichnis

(1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval.Carcinog.Risks Hum.* **61:1-241.**, 1-241.

Abbas, A. K. and Lichtmann, A. H. (2003). "Cellular and Molecular Immunology." Saunders, Philadelphia.

Achyut, B. R., Moorchung, N., Srivastava, A. N., Gupta, N. K., and Mittal, B. (2008a). Risk of lymphoid follicle development in patients with chronic antral gastritis: role of endoscopic features, histopathological parameters, CagA status and interleukin-1 gene polymorphisms. *Inflamm.Res.* **57**, 51-56.

Achyut, B. R., Tripathi, P., Ghoshal, U. C., Moorchung, N., and Mittal, B. (2008b). Interleukin-10 (-819 C/T) and tumor necrosis factor-alpha (-308 G/A) gene variants influence gastritis and lymphoid follicle development. *Dig.Dis.Sci.* **53**, 622-629.

Adachi, Y., Toki, J., Ikebukuro, K., Tomita, M., Kaneda, H., Tanabe, A., Jun, L., Minamino, K., Suzuki, Y., Taketani, S., and Ikehara, S. (2002). Immature dendritic cells (CD11c+ CD3- B220- cells) present in mouse peripheral blood. *Immunobiology.* **206**, 354-367.

Agarwal, K. and Agarwal, S. (2008). *Helicobacter pylori* vaccine: from past to future. *Mayo Clin.Proc.* **83**, 169-175.

Agrawal, S., Agrawal, A., Dougherty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T., and Pulendran, B. (2003). Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J.Immunol.* **171**, 4984-4989.

Akanuma, M., Maeda, S., Ogura, K., Mitsuno, Y., Hirata, Y., Ikenoue, T., Otsuka, M., Watanabe, T., Yamaji, Y., Yoshida, H., Kawabe, T., Shiratori, Y., and Omata, M. (2002). The evaluation of putative virulence factors of *Helicobacter pylori* for gastroduodenal disease by use of a short-term Mongolian gerbil infection model. *J.Infect.Dis.* **185**, 341-347.

Akhiani, A. A., Pappo, J., Kabok, Z., Schon, K., Gao, W., Franzen, L. E., and Lycke, N. (2002). Protection against *Helicobacter pylori* infection following immunization is IL-12-dependent and mediated by Th1 cells. *J.Immunol.* **169**, 6977-6984.

Algood, H. M., Gallo-Romero, J., Wilson, K. T., Peek, R. M., Jr., and Cover, T. L. (2007). Host response to *Helicobacter pylori* infection before initiation of the adaptive immune response. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **51**, 577-586.

Alvarez-Arellano, L., Camorlinga-Ponce, M., Maldonado-Bernal, C., and Torres, J. (2007). Activation of human neutrophils with *Helicobacter pylori* and the role of Toll-like receptors 2 and 4 in the response. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **51**, 473-479.

Anand, A. R., Cucchiaroni, M., Terwilliger, E. F., and Ganju, R. K. (2008). The tyrosine kinase pyk2 mediates lipopolysaccharide-induced IL-8 expression in human endothelial cells. *J.Immunol.* **180**, 5636-5644.



Anderson, A. E., Worku, M. L., Khamri, W., Bamford, K. B., Walker, M. M., and Thursz, M. R. (2007). TLR9 polymorphisms determine murine lymphocyte responses to *Helicobacter*: results from a genome-wide scan. *Eur.J.Immunol.* **37**, 1548-1561.

Asahi, K., Fu, H. Y., Hayashi, Y., Eguchi, H., Murata, H., Tsujii, M., Tsuji, S., Tanimura, H., and Kawano, S. (2007). *Helicobacter pylori* infection affects Toll-like receptor 4 expression in human gastric mucosa. *Hepatogastroenterology*. **54**, 1941-1944.

Asahi, M., Azuma, T., Ito, S., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., Tsubokawa, M., Tohyama, Y., Maeda, S., Omata, M., Suzuki, T., and Sasakawa, C. (2000). *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *Journal of Experimental Medicine* **191**, 593-602.

Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R. M., Jr., Tummuru, M. K., Blaser, M. J., and Cover, T. L. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J.Biol.Chem.* **270**, 17771-17777.

Augusto, A. C., Miguel, F., Mendonca, S., Pedrazzoli, J., Jr., and Gurgueira, S. A. (2007). Oxidative stress expression status associated to *Helicobacter pylori* virulence in gastric diseases. *Clin.Biochem.* **40**, 615-622.

Ayraud, S., Janvier, B., and Fauchere, J. L. (2002). Experimental colonization of mice by fresh clinical isolates of *Helicobacter pylori* is not influenced by the *cagA* status and the *vacA* genotype. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **34**, 169-172.

Bacci, A., Montagnoli, C., Perruccio, K., Bozza, S., Gaziano, R., Pitzurra, L., Velardi, A., d'Ostiani, C. F., Cutler, J. E., and Romani, L. (2002). Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. *J.Immunol.* **168**, 2904-2913.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* **18**:767-811., 767-811.

Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. **392**, 245-252.

Baron, C., Raposo, G., Scholl, S. M., Bausinger, H., Tenza, D., Bohbot, A., Pouillart, P., Goud, B., Hanau, D., and Salamero, J. (2001). Modulation of MHC class II transport and lysosome distribution by macrophage-colony stimulating factor in human dendritic cells derived from monocytes. *J.Cell Sci.* **114**, 999-1010.

Bercovici, N., Haicheur, N., Massicard, S., Vernel-Pauillac, F., Adotevi, O., Landais, D., Gorin, I., Robert, C., Prince, H. M., Grob, J. J., Leccia, M. T., Lesimple, T., Wijdenes, J., Bartholeyns, J., Fridman, W. H., Salcedo, M., Ferries, E., and Tartour, E. (2008). Analysis and characterization of antitumor T-cell response after administration of dendritic cells loaded with allogeneic tumor lysate to metastatic melanoma patients. *J.Immunother.* **31**, 101-112.

Berg, D. J., Lynch, N. A., Lynch, R. G., and Lauricella, D. M. (1998). Rapid development of severe hyperplastic gastritis with gastric epithelial dedifferentiation in *Helicobacter felis*-infected IL-10(-/-) mice. *Am.J.Pathol.* **152**, 1377-1386.

Bergin, P. J., Raghavan, S., Svensson, H., Starckx, S., Van, A., I, Gjertsson, I., Opdenakker, G., and Quiding-Jarbrink, M. (2008). Gastric gelatinase B/matrix

metalloproteinase-9 is rapidly increased in *Helicobacter felis*-induced gastritis. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **52**, 88-98.

Berner, M. D., Sura, M. E., Alves, B. N., and Hunter, K. W., Jr. (2005). IFN-gamma primes macrophages for enhanced TNF-alpha expression in response to stimulatory and non-stimulatory amounts of microparticulate beta-glucan. *Immunol.Lett.* **98**, 115-122.

Bernstein, M. B., Chakraborty, M., Wansley, E. K., Guo, Z., Franzusoff, A., Mostbock, S., Sabzevari, H., Schlom, J., and Hodge, J. W. (2008). Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (yeast-CEA) as a potent activator of murine dendritic cells. *Vaccine.* **26**, 509-521.

Bimczok, D., Clements, R. H., Waites, K. B., Novak, L., Eckhoff, D. E., Mannon, P. J., Smith, P. D., and Smythies, L. E. (2010). Human primary gastric dendritic cells induce a Th1 response to *H. pylori*. *Mucosal.Immunol.* **3**, 260-269.

Blaser, M. J. (1990). *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J.Infect.Dis.* **161**, 626-633.

Blaser, M. J. and Berg, D. E. (2001). *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J.Clin.Invest.* **107**, 767-773.

Blaser, M. J. and Crabtree, J. E. (1996). CagA and the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Am.J.Clin.Pathol.* **106**, 565-567.

Bohr, U. R., Annibale, B., Franceschi, F., Roccarina, D., and Gasbarrini, A. (2007). Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection -- other *Helicobacters*. *Helicobacter.* **12 Suppl 1:45-53.**, 45-53.

Boisvert, W. A., Santiago, R., Curtiss, L. K., and Terkeltaub, R. A. (1998). A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J.Clin.Invest.* **101**, 353-363.

Boncristiano, M., Paccani, S. R., Barone, S., Ulivieri, C., Patrussi, L., Ilver, D., Amedei, A., D'Elis, M. M., Telford, J. L., and Baldari, C. T. (2003). The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 1887-1897.

Boudreau, J. E., Bonehill, A., Thielemans, K., and Wan, Y. (2011). Engineering Dendritic Cells to Enhance Cancer Immunotherapy. *Mol.Ther.*

Braun, M. C., He, J., Wu, C. Y., and Kelsall, B. L. (1999). Cholera toxin suppresses interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor beta1 and beta2 chain expression. *Journal of Experimental Medicine* **189**, 541-552.

Brinkmann, V. and Kristofic, C. (1997). Massive production of Th2 cytokines by human CD4+ effector T cells transiently expressing the natural killer cell marker CD57/HNK1. *Immunology.* **91**, 541-547.

Bulajic, M., Maisonneuve, P., Schneider-Brachert, W., Muller, P., Reischl, U., Stimec, B., Lehn, N., Lowenfels, A. B., and Lohr, M. (2002). *Helicobacter pylori* and the risk of benign and malignant biliary tract disease. *Cancer* **95**, 1946-1953.

Burne, R. A. and Chen, Y. Y. (2000). Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes.Infect.* **2**, 533-542.

- Bury-Mone, S., Kaakoush, N. O., Asencio, C., Megraud, F., Thibonnier, M., De Reuse, H., and Mendz, G. L. (2006). Is *Helicobacter pylori* a true microaerophile? *Helicobacter*. **11**, 296-303.
- Buzas, G. M. (2010). [*Helicobacter pylori* -- 2010]. *Orv.Hetil.* **151**, 2003-2010.
- Cao, H., Urban, J. F., Jr., and Anderson, R. A. (2008). Cinnamon polyphenol extract affects immune responses by regulating anti- and proinflammatory and glucose transporter gene expression in mouse macrophages. *J.Nutr.* **138**, 833-840.
- Cao, X., Tsukamoto, T., Nozaki, K., Tanaka, H., Cao, L., Toyoda, T., Takasu, S., Ban, H., Kumagai, T., and Tatematsu, M. (2007). Severity of gastritis determines glandular stomach carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci.* **98**, 478-483.
- Caron, G., Delneste, Y., Roelandts, E., Duez, C., Bonnefoy, J. Y., Pestel, J., and Jeannin, P. (2001). Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *J.Immunol.* **167**, 3682-3686.
- Celli, S., Garcia, Z., Beuneu, H., and Bousso, P. (2008). Decoding the dynamics of T cell-dendritic cell interactions in vivo. *Immunol.Rev.* **221:182-7.**, 182-187.
- Cervi, L., MacDonald, A. S., Kane, C., Dzierszinski, F., and Pearce, E. J. (2004). Cutting edge: dendritic cells copulsed with microbial and helminth antigens undergo modified maturation, segregate the antigens to distinct intracellular compartments, and concurrently induce microbe-specific Th1 and helminth-specific Th2 responses. *J.Immunol.* **172**, 2016-2020.
- Chang, Y. J., Wu, M. S., Lin, J. T., Sheu, B. S., Muta, T., Inoue, H., and Chen, C. C. (2004). Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation. *Mol.Pharmacol.* **66**, 1465-1477.
- Chaouche-Dridier, N., Kaparakis, M., Karrar, A., Fernandez, M. I., Carneiro, L. A., Viala, J., Boneca, I. G., Moran, A. P., Philpott, D. J., and Ferrero, R. L. (2009). A commensal *Helicobacter* sp. of the rodent intestinal flora activates TLR2 and NOD1 responses in epithelial cells. *PLoS.ONE.* **4**, e5396.
- Chen, D., Stenstrom, B., Zhao, C. M., and Wadstrom, T. (2007). Does *Helicobacter pylori* infection per se cause gastric cancer or duodenal ulcer? Inadequate evidence in Mongolian gerbils and inbred mice. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **50**, 184-189.
- Chen, M., Lee, A., and Hazell, S. (1992). Immunisation against gastric *Helicobacter* infection in a mouse/*Helicobacter felis* model. *Lancet* **339**, 1120-1121.
- Chen, M., Wang, Y. H., Wang, Y., Huang, L., Sandoval, H., Liu, Y. J., and Wang, J. (2006). Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science.* **311**, 1160-1164.
- Chi, J., Lu, M., Fu, B., Nakajima, S., and Hattori, T. (1999). Induction of gastritis and gastric ulcer in Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. *Chin Med.J.(Engl.)*. **112**, 998-1000.
- Ching, C. K., Wong, B. C., Kwok, E., Ong, L., Covacci, A., and Lam, S. K. (1996). Prevalence of CagA-bearing *Helicobacter pylori* strains detected by the anti-CagA assay in patients with peptic ulcer disease and in controls. *Am.J.Gastroenterol.* **91**, 949-953.

- Chirgwin, S. R., Nowling, J. M., Coleman, S. U., and Klei, T. R. (2003). Effect of immunostimulatory oligodeoxynucleotides on host responses and the establishment of *Brugia pahangi* in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J.Parasitol.* **89**, 483-489.
- Cho, Y. S., Challa, S., Clancy, L., and Chan, F. K. (2010). Lipopolysaccharide-induced expression of TRAIL promotes dendritic cell differentiation. *Immunology* **130**, 504-515.
- Christie, P. J. and Vogel, J. P. (2000). Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* **8**, 354-360.
- Chu, C. S., Kim, S. H., June, C. H., and Coukos, G. (2008). Immunotherapy opportunities in ovarian cancer. *Expert.Rev.Anticancer Ther.* **8**, 243-257.
- Cinque, S. M., Rocha, G. A., Correa-Oliveira, R., Soares, T. F., Moura, S. B., Rocha, A. M., Nogueira, A. M., Cabral, M. M., Vieira, L. Q., Martins-Filho, O. A., and Queiroz, D. M. (2006). The role of IFN-gamma and IL-4 in gastric mucosa inflammation associated with *Helicobacter heilmannii* type 1 infection. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **39**, 253-261.
- Coccia, E. M., Remoli, M. E., Di Giacinto, C., Del Zotto, B., Giacomini, E., Monteleone, G., and Boirivant, M. (2005). Cholera toxin subunit B inhibits IL-12 and IFN- $\gamma$  production and signaling in experimental colitis and Crohn's disease. *Gut.* **54**, 1558-1564.
- Cochand, L., Isler, P., Songeon, F., and Nicod, L. P. (1999). Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **21**, 547-554.
- Comunian, L. B., Moura, S. B., Paglia, A. P., Nicoli, J. R., Guerra, J. B., Rocha, G. A., and Queiroz, D. M. (2006). Detection of *Helicobacter* species in the gastrointestinal tract of wild rodents from Brazil. *Curr.Microbiol.* **53**, 370-373.
- Con, S. A., Takeuchi, H., Con-Chin, G. R., Con-Chin, V. G., Yasuda, N., and Con-Wong, R. (2009). Role of bacterial and genetic factors in gastric cancer in Costa Rica. *World J.Gastroenterol.* **15**, 211-218.
- Connolly, N. C., Whiteside, T. L., Wilson, C., Kondragunta, V., Rinaldo, C. R., and Riddler, S. A. (2008). Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected individuals. *Clin.Vaccine Immunol.* **15**, 284-292.
- Contreras, M., Thiberge, J. M., Mandrand-Berthelot, M. A., and Labigne, A. (2003). Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. *Mol.Microbiol.* **49**, 947-963.
- Cornelie, S., Hoebeke, J., Schacht, A. M., Bertin, B., Vicogne, J., Capron, M., and Riveau, G. (2004). Direct evidence that toll-like receptor 9 (TLR9) functionally binds plasmid DNA by specific cytosine-phosphate-guanine motif recognition. *J.Biol.Chem.* **279**, 15124-15129.
- Corradin, S. B., Buchmuller-Rouiller, Y., and Mauel, J. (1991). Phagocytosis enhances murine macrophage activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Eur.J.Immunol.* **21**, 2553-2558.
- Court, M., Robinson, P. A., Dixon, M. F., Jeremy, A. H., and Crabtree, J. E. (2003). The effect of gender on *Helicobacter felis*-mediated gastritis, epithelial cell proliferation, and apoptosis in the mouse model. *J.Pathol.* **201**, 303-311.

- Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., and Figura, N. (1993). Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**, 5791-5795.
- Cover, T. L., Glupczynski, Y., Lage, A. P., Burette, A., Tummuru, M. K., Perez-Perez, G. I., and Blaser, M. J. (1995). Serologic detection of infection with cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 1496-1500.
- Cover, T. L., Krishna, U. S., Israel, D. A., and Peek, R. M., Jr. (2003). Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res.* **63**, 951-957.
- Crabtree, J. E., Court, M., Aboshkiwa, M. A., Jeremy, A. H., Dixon, M. F., and Robinson, P. A. (2004). Gastric mucosal cytokine and epithelial cell responses to *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J.Pathol.* **202**, 197-207.
- Craxton, A., Magaletti, D., Ryan, E. J., and Clark, E. A. (2003). Macrophage- and dendritic cell--dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF. *Blood.* **101**, 4464-4471.
- Creusot, R. J., Yaghoubi, S. S., Kodama, K., Dang, D. N., Dang, V. H., Breckpot, K., Thielemans, K., Gambhir, S. S., and Fathman, C. G. (2008). Tissue-targeted therapy of autoimmune diabetes using dendritic cells transduced to express IL-4 in NOD mice. *Clin.Immunol.* **127**, 176-187.
- Czinn, S. J. and Nedrud, J. G. (1991). Oral immunization against *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* **59**, 2359-2363.
- D'Elios, M. M., Amedei, A., Benagiano, M., Azzurri, A., and Del Prete, G. (2005). *Helicobacter pylori*, T cells and cytokines: the "dangerous liaisons". *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **44**, 113-119.
- D'Elios, M. M., Manghetti, M., De Carli, M., Costa, F., Baldari, C. T., Burroni, D., Telford, J. L., Romagnani, S., and Del Prete, G. (1997). T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J.Immunol.* **158**, 962-967.
- Das, J. C. and Paul, N. (2007). Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Indian J.Pediatr.* **74**, 287-290.
- Day, A. S., Su, B., Ceponis, P. J., Jones, N. L., Yau, E., Sieveking, D., and Sherman, P. M. (2004). *Helicobacter pylori* infection induces interleukin-18 production in gastric epithelial (AGS) cells. *Dig.Dis.Sci.* **49**, 1830-1835.
- de Jong, E. C., Vieira, P. L., Kalinski, P., Schuitemaker, J. H., Tanaka, Y., Wierenga, E. A., Yazdanbakhsh, M., and Kapsenberg, M. L. (2002). Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J.Immunol.* **168**, 1704-1709.
- De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., Lespagnard, L., Heinen, E., De Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1996). Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *Journal of Experimental Medicine* **184**, 1413-1424.

- Del Cacho, E., Gallego, M., Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Quilez, J., Lillehoj, E. P., and Sanchez-Acedo, C. (2011). Induction of protective immunity against *Eimeria tenella* infection using antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes. *Vaccine*.
- Del Giudice, G. and Michetti, P. (2004). Inflammation, immunity and vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. **9 Suppl 1:23-8**, 23-28.
- Delaguillaumie, A., Marin-Esteban, V., Setterblad, N., Leh, L. J., Assier, E., Gelin, C., Charron, D., Galy, A., and Mooney, N. (2008). Contrasting cytoskeletal regulation of MHC class II peptide presentation by human B cells or dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* **38**, 1096-1105.
- DeLyria, E. S., Redline, R. W., and Blanchard, T. G. (2009). Vaccination of mice against *H pylori* induces a strong Th-17 response and immunity that is neutrophil dependent. *Gastroenterology* **136**, 247-256.
- Deml, L., Aigner, M., Decker, J., Eckhardt, A., Schutz, C., Mittl, P. R., Barabas, S., Denk, S., Knoll, G., Lehn, N., and Schneider-Brachert, W. (2005). Characterization of the *Helicobacter pylori* cysteine-rich protein A as a T-helper cell type 1 polarizing agent. *Infection and Immunity* **73**, 4732-4742.
- Deml, L., Aigner, M., Eckhardt, A., Decker, J., Lehn, N., and Schneider-Brachert, W. (2004). Application of single-cell cultures of mouse splenocytes as an assay system to analyze the immunomodulatory properties of bacterial components. *Methods Mol.Med.* **94**, 159-175.
- Dewhirst, F. E., Seymour, C., Fraser, G. J., Paster, B. J., and Fox, J. G. (1994). Phylogeny of *Helicobacter* isolates from bird and swine feces and description of *Helicobacter pametensis* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **44**, 553-560.
- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Pompilio, A., Zappacosta, R., Piccolomini, M., and Neri, M. (2007). Serum and mucosal cytokine profiles in patients with active *Helicobacter pylori* and ischemic heart disease: is there a relationship? *Int.J.Immunopathol.Pharmacol.* **20**, 163-172.
- Ding, L., Linsley, P. S., Huang, L. Y., Germain, R. N., and Shevach, E. M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J.Immunol.* **151**, 1224-1234.
- Doganci, A., Sauer, K., Karwot, R., and Finotto, S. (2005). Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. *Clin.Rev.Allergy Immunol.* **28**, 257-270.
- Dubois, A., Fiala, N., Heman-Ackah, L. M., Drazek, E. S., Tarnawski, A., Fishbein, W. N., Perez-Perez, G. I., and Blaser, M. J. (1994). Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: a model for spiral bacteria infection in humans. *Gastroenterology*. **106**, 1405-1417.
- Dzierzanowska-Fangrat, K., Michalkiewicz, J., Cielecka-Kuszyk, J., Nowak, M., Celinska-Cedro, D., Rozynek, E., Dzierzanowska, D., and Crabtree, J. E. (2008). Enhanced gastric IL-18 mRNA expression in *Helicobacter pylori*-infected children is associated with macrophage infiltration, IL-8, and IL-1 beta mRNA expression. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* **20**, 314-319.
- Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R., and Krakowka, S. (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infection and Immunity* **59**, 2470-2475.

- Eaton, K. A. and Krakowka, S. (1994). Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* **62**, 3604-3607.
- Eaton, K. A., Logan, S. M., Baker, P. E., Peterson, R. A., Monteiro, M. A., and Altman, E. (2004). *Helicobacter pylori* with a truncated lipopolysaccharide O chain fails to induce gastritis in SCID mice injected with splenocytes from wild-type C57BL/6J mice. *Infection and Immunity* **72**, 3925-3931.
- Eaton, K. A., Suerbaum, S., Josenhans, C., and Krakowka, S. (1996). Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infection and Immunity* **64**, 2445-2448.
- Eidt, S., Stolte, M., and Fischer, R. (1994). *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J.Clin.Pathol.* **47**, 436-439.
- Elson, G., Dunn-Siegrist, I., Daubeuf, B., and Pugin, J. (2007). Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Blood*. **109**, 1574-1583.
- Engstrand, L., Gustavsson, S., Jorgensen, A., Schwan, A., and Scheynius, A. (1990). Inoculation of barrier-born pigs with *Helicobacter pylori*: a useful animal model for gastritis type B. *Infection and Immunity* **58**, 1763-1768.
- Ernst, P. B. and Gold, B. D. (2000). The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu.Rev.Microbiol.* **54:615-40.**, 615-640.
- Ernst, P. B. and Pappo, J. (2001). T-cell-mediated mucosal immunity in the absence of antibody: lessons from *Helicobacter pylori* infection. *Acta Odontol.Scand.* **59**, 216-221.
- Fajardo-Moser, M., Berzel, S., and Moll, H. (2008). Mechanisms of dendritic cell-based vaccination against infection. *Int.J.Med.Microbiol.* **298**, 11-20.
- Farrar, J. D., Asnagli, H., and Murphy, K. M. (2002). T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J.Clin.Invest.* **109**, 431-435.
- Feng, B. S., Zheng, P. Y., Chen, X., Liao, X. Q., and Yang, P. C. (2008). Investigation of the role of cholera toxin in assisting the initiation of the antigen-specific Th2 response. *Immunol.Invest.* **37**, 782-797.
- Fernandez, K. R., Hansen, L. M., Vandamme, P., Beaman, B. L., and Solnick, J. V. (2002). Captive rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) are commonly infected with *Helicobacter cinaedi*. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1908-1912.
- Ferrero, R. L. (2005). Innate immune recognition of the extracellular mucosal pathogen, *Helicobacter pylori*. *Mol.Immunol.* **42**, 879-885.
- Ferrero, R. L., Ave, P., Radcliff, F. J., Labigne, A., and Huerre, M. R. (2000). Outbred mice with long-term *Helicobacter felis* infection develop both gastric lymphoid tissue and glandular hyperplastic lesions. *J.Pathol.* **191**, 333-340.
- Fischer, W., Puls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S., and Haas, R. (2001). Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol.Microbiol.* **42**, 1337-1348.

Flahou, B., Haesebrouck, F., Pasmans, F., D'Herde, K., Driessen, A., Van Deun, K., Smet, A., Duchateau, L., Chiers, K., and Ducatelle, R. (2010). *Helicobacter suis* causes severe gastric pathology in mouse and mongolian gerbil models of human gastric disease. *PLoS ONE*. **5**, e14083.

Flahou, B., Hellemans, A., Meyns, T., Duchateau, L., Chiers, K., Baele, M., Pasmans, F., Haesebrouck, F., and Ducatelle, R. (2009). Protective immunization with homologous and heterologous antigens against *Helicobacter suis* challenge in a mouse model. *Vaccine*. **27**, 1416-1421.

Fonseca, D. M., Paula, M. O., Wowk, P. F., Campos, L. W., Gembre, A. F., Turato, W. M., Ramos, S. G., Dias-Baruffi, M., Barboza, R., Gomes, E., Horn, C., Marchal, G., Arruda, L. K., Russo, M., and Bonato, V. L. (2011). IFN-gamma-mediated efficacy of allergen-free immunotherapy using mycobacterial antigens and CpG-ODN. *Immunol. Cell Biol.*

Fox, J. G., Batchelder, M., Marini, R., Yan, L., Handt, L., Li, X., Shames, B., Hayward, A., Campbell, J., and Murphy, J. C. (1995). *Helicobacter pylori*-induced gastritis in the domestic cat. *Infection and Immunity* **63**, 2674-2681.

Fox, J. G., Wang, T. C., Rogers, A. B., Poutahidis, T., Ge, Z., Taylor, N., Dangler, C. A., Israel, D. A., Krishna, U., Gaus, K., and Peek, R. M., Jr. (2003). Host and microbial constituents influence *Helicobacter pylori*-induced cancer in a murine model of hypergastrinemia. *Gastroenterology*. **124**, 1879-1890.

Franco, A. T., Johnston, E., Krishna, U., Yamaoka, Y., Israel, D. A., Nagy, T. A., Wroblewski, L. E., Piazuelo, M. B., Correa, P., and Peek, R. M., Jr. (2008). Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res*. **68**, 379-387.

Freudenberg, M. A., Kalis, C., Chvatchko, Y., Merlin, T., Gumenscheimer, M., and Galanos, C. (2003). Role of interferons in LPS hypersensitivity. *J. Endotoxin Res.* **9**, 308-312.

Fujita, M., Zhu, X., Ueda, R., Sasaki, K., Kohanbash, G., Kastenhuber, E. R., McDonald, H. A., Gibson, G. A., Watkins, S. C., Muthuswamy, R., Kalinski, P., and Okada, H. (2009). Effective immunotherapy against murine gliomas using type 1 polarizing dendritic cells--significant roles of CXCL10. *Cancer Res*. **69**, 1587-1595.

Fukata, M. and Abreu, M. T. (2008). Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies. *Oncogene*. **27**, 234-243.

Galamb, O., Gyorffy, B., Sipos, F., Dinya, E., Krenacs, T., Berczi, L., Szoke, D., Spisak, S., Solymosi, N., Nemeth, A. M., Juhasz, M., Molnar, B., and Tulassay, Z. (2008). *Helicobacter pylori* and antrum erosion-specific gene expression patterns: the discriminative role of CXCL13 and VCAM1 transcripts. *Helicobacter*. **13**, 112-126.

Galkin, V. E., Yu, X., Bielnicki, J., Heuser, J., Ewing, C. P., Guerry, P., and Egelman, E. H. (2008). Divergence of quaternary structures among bacterial flagellar filaments. *Science*. **320**, 382-385.

Gamboa-Dominguez, A., Ubbelohde, T., Saqui-Salces, M., Romano-Mazzoti, L., Cervantes, M., Dominguez-Fonseca, C., de la Luz, E. M., and Ruiz-Palacios, G. M. (2007). Salt and stress synergize *H. pylori*-induced gastric lesions, cell proliferation, and p21 expression in Mongolian gerbils. *Dig. Dis. Sci.* **52**, 1517-1526.



- Garcia-Zepeda, E. A., Rojas-Lopez, A., Esquivel-Velazquez, M., and Ostoa-Saloma, P. (2007). Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. *Parasite Immunol.* **29**, 679-684.
- Garhart, C. A., Heinzl, F. P., Czinn, S. J., and Nedrud, J. G. (2003). Vaccine-induced reduction of *Helicobacter pylori* colonization in mice is interleukin-12 dependent but gamma interferon and inducible nitric oxide synthase independent. *Infection and Immunity* **71**, 910-921.
- Gaucher, D. and Chadee, K. (2001). Molecular cloning of gerbil interleukin 12 and its expression as a bioactive single-chain protein. *Cytokine*. **14**, 177-183.
- Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., and Haas, R. (2003). *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*. **301**, 1099-1102.
- Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Boren, T., Rad, R., Schepp, W., Miehke, S., Classen, M., and Prinz, C. (1999). Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 12778-12783.
- Gioannini, T. L. and Weiss, J. P. (2007). Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunol.Res.* **39**, 249-260.
- Gionchetti, P., Vaira, D., Campieri, M., Holton, J., Menegatti, M., Belluzzi, A., Bertinelli, E., Ferretti, M., Brignola, C., Miglioli, M., and . (1994). Enhanced mucosal interleukin-6 and -8 in *Helicobacter pylori*-positive dyspeptic patients. *Am.J.Gastroenterol.* **89**, 883-887.
- Goll, R., Gruber, F., Olsen, T., Cui, G., Raschpichler, G., Buset, M., Asfeldt, A. M., Husebekk, A., and Florholmen, J. (2007). *Helicobacter pylori* stimulates a mixed adaptive immune response with a strong T-regulatory component in human gastric mucosa. *Helicobacter*. **12**, 185-192.
- Goodman, K. J. and Correa, P. (2000). Transmission of *Helicobacter pylori* among siblings. *Lancet* **355**, 358-362.
- Gooz, M., Shaker, M., Gooz, P., and Smolka, A. J. (2003). Interleukin 1beta induces gastric epithelial cell matrix metalloproteinase secretion and activation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. **52**, 1250-1256.
- Gorrell, R. J. and Robins-Browne, R. M. (2009). Antibody-mediated protection against infection with *Helicobacter pylori* in a suckling mouse model of passive immunity. *Infection and Immunity* **77**, 5116-5129.
- Graham, D. Y., Malaty, H. M., Evans, D. G., Evans, D. J. J., Klein, P. D., and Adam, E. (1991). Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology* **100**, 1495-1501.
- Graham, K. L., Lee, L. Y., Higgins, J. P., Steinman, L., Utz, P. J., and Ho, P. P. (2010). Treatment with a toll-like receptor inhibitory GpG oligonucleotide delays and attenuates lupus nephritis in NZB/W mice. *Autoimmunity* **43**, 140-155.
- Granucci, F., Ferrero, E., Foti, M., Aggujaro, D., Vettoretto, K., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1999). Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes.Infect.* **1**, 1079-1084.
- Grauer, O. M., Suttmüller, R. P., van Maren, W., Jacobs, J. F., Bennink, E., Toonen, L. W., Nierkens, S., and Adema, G. J. (2008). Elimination of regulatory T cells is essential for an

effective vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells in a murine glioma model. *Int.J.Cancer* **122**, 1794-1802.

Gresch, O., Engel, F. B., Nesic, D., Tran, T. T., England, H. M., Hickman, E. S., Korner, I., Gan, L., Chen, S., Castro-Obregon, S., Hammermann, R., Wolf, J., Muller-Hartmann, H., Nix, M., Siebenkotten, G., Kraus, G., and Lun, K. (2004). New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* **33**, 151-163.

Guan, X., Peng, J. R., Yuan, L., Wang, H., Wei, Y. H., and Leng, X. S. (2004). A novel, rapid strategy to form dendritomas from human dendritic cells and hepatocellular carcinoma cell line HCCLM3 cells using mature dendritic cells derived from human peripheral blood CD14+ monocytes within 48 hours of in vitro culture. *World J.Gastroenterol.* **10**, 3564-3568.

Guenova, E., Volz, T., Sauer, K., Kaesler, S., Muller, M. R., Wolbing, F., Chen, K., Schwarzler, C., Brossart, P., Rocken, M., and Biedermann, T. (2008). IL-4-mediated fine tuning of IL-12p70 production by human DC. *Eur.J.Immunol.* **38**, 3138-3149.

Guiney, D. G., Hasegawa, P., and Cole, S. P. (2003). *Helicobacter pylori* preferentially induces interleukin 12 (IL-12) rather than IL-6 or IL-10 in human dendritic cells. *Infection and Immunity* **71**, 4163-4166.

Hackstein, H., Taner, T., Logar, A. J., and Thomson, A. W. (2002). Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells. *Blood*. **100**, 1084-1087.

Haeberle, H. A., Kubin, M., Bamford, K. B., Garofalo, R., Graham, D. Y., El-Zaatari, F., Karttunen, R., Crowe, S. E., Reyes, V. E., and Ernst, P. B. (1997). Differential stimulation of interleukin-12 (IL-12) and IL-10 by live and killed *Helicobacter pylori* in vitro and association of IL-12 production with gamma interferon-producing T cells in the human gastric mucosa. *Infection and Immunity* **65**, 4229-4235.

Hafsi, N., Volland, P., Schwendy, S., Rad, R., Reindl, W., Gerhard, M., and Prinz, C. (2004). Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro. *J.Immunol.* **173**, 1249-1257.

Hammad, H. and Lambrecht, B. N. (2008). Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat.Rev.immunol.* **8**, 193-204.

Handt, L. K., Fox, J. G., Stalis, I. H., Rufo, R., Lee, G., Linn, J., Li, X., and Kleanthous, H. (1995). Characterization of feline *Helicobacter pylori* strains and associated gastritis in a colony of domestic cats. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 2280-2289.

Harbour, S. N., Every, A. L., Edwards, S., and Sutton, P. (2008). Systemic immunization with unadjuvanted whole *Helicobacter pylori* protects mice against heterologous challenge. *Helicobacter*. **13**, 494-499.

Harris, P. R., Wright, S. W., Serrano, C., Riera, F., Duarte, I., Torres, J., Pena, A., Rollan, A., Viviani, P., Guiraldes, E., Schmitz, J. M., Lorenz, R. G., Novak, L., Smythies, L. E., and Smith, P. D. (2008). *Helicobacter pylori* gastritis in children is associated with a regulatory T-cell response. *Gastroenterology*. **134**, 491-499.

Hayati, A. R. and Zulkarnaen, M. (2007). An immunohistochemical study of CD1a and CD83-positive infiltrating dendritic cell density in cervical neoplasia. *Int.J.Gynecol.Pathol.* **26**, 83-88.

He, X. X., Yang, J., Zheng, X. L., Ding, Y. W., Shen, Q. Y., Liu, W., and Zhao, Y. H. (2005). The effect of *Helicobacter pylori* infection on expression of macrophage migration inhibitory factor by T cells and macrophages in gastric mucosa. *Chin Med.J.(Engl.)*. **118**, 1201-1205.

Herrera, O. B., Brett, S., and Lechler, R. I. (2002). Infection of mouse bone marrow-derived dendritic cells with recombinant adenovirus vectors leads to presentation of encoded antigen by both MHC class I and class II molecules-potential benefits in vaccine design. *Vaccine*. **21**, 231-242.

Hildebrandt, E. and McGee, D. J. (2009). *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide modification, Lewis antigen expression, and gastric colonization are cholesterol-dependent. *BMC.Microbiol.* **9**, 258.

Hirayama, F., Takagi, S., Kusuhaara, H., Iwao, E., Yokoyama, Y., and Ikeda, Y. (1996a). Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. *J.Gastroenterol.* **31**, 755-757.

Hirayama, F., Takagi, S., Yokoyama, Y., Iwao, E., and Ikeda, Y. (1996b). Establishment of gastric *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J.Gastroenterol.* **31 Suppl 9**, 24-28.

Ho, P. P., Fontoura, P., Platten, M., Sobel, R. A., DeVoss, J. J., Lee, L. Y., Kidd, B. A., Tomooka, B. H., Capers, J., Agrawal, A., Gupta, R., Zernik, J., Yee, M. K., Lee, B. J., Garren, H., Robinson, W. H., and Steinman, L. (2005). A suppressive oligodeoxynucleotide enhances the efficacy of myelin cocktail/IL-4-tolerizing DNA vaccination and treats autoimmune disease. *J.Immunol.* **175**, 6226-6234.

Ho, P. P., Fontoura, P., Ruiz, P. J., Steinman, L., and Garren, H. (2003). An immunomodulatory GpG oligonucleotide for the treatment of autoimmunity via the innate and adaptive immune systems. *J.Immunol.* **171**, 4920-4926.

Hoffman, P. S., Vats, N., Hutchison, D., Butler, J., Chisholm, K., Sisson, G., Raudonikienė, A., Marshall, J. S., and Veldhuyzen van Zanten, S. J. (2003). Development of an interleukin-12-deficient mouse model that is permissive for colonization by a motile KE26695 strain of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* **71**, 2534-2541.

Honda, S., Fujioka, T., Tokieda, M., Gotoh, T., Nishizono, A., and Nasu, M. (1998a). Gastric ulcer, atrophic gastritis, and intestinal metaplasia caused by *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Scand.J.Gastroenterol.* **33**, 454-460.

Honda, S., Fujioka, T., Tokieda, M., Satoh, R., Nishizono, A., and Nasu, M. (1998b). Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res.* **58**, 4255-4259.

Hou, B., Benson, A., Kuzmich, L., DeFranco, A. L., and Yarovinsky, F. (2011). Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **108**, 278-283.

Huang, C. F., Wang, C. C., Wu, T. C., Chu, C. H., and Peng, H. J. (2007). Effect of sublingual administration with a native or denatured protein allergen and adjuvant CpG oligodeoxynucleotides or cholera toxin on systemic T(H)2 immune responses and mucosal immunity in mice. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* **99**, 443-452.

- Hur, K., Niwa, T., Toyoda, T., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Yang, H. K., and Ushijima, T. (2011). Insufficient role of cell proliferation in aberrant DNA methylation induction and involvement of specific types of inflammation. *Carcinogenesis* **32**, 35-41.
- Ikeno, T., Ota, H., Sugiyama, A., Ishida, K., Katsuyama, T., Genta, R. M., and Kawasaki, S. (1999). Helicobacter pylori-induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils. *Am.J.Pathol.* **154**, 951-960.
- Inaba, K., Swiggard, W. J., Steinman, R. M., Romani, N., and Schuler, G. (2001). Isolation of dendritic cells. *Curr.Protoc.Immunol.* **Chapter 3**, Unit.
- Ismail, H. F., Fick, P., Zhang, J., Lynch, R. G., and Berg, D. J. (2003). Depletion of neutrophils in IL-10(-/-) mice delays clearance of gastric Helicobacter infection and decreases the Th1 immune response to Helicobacter. *J.Immunol.* **170**, 3782-3789.
- Israel, D. A., Salama, N., Arnold, C. N., Moss, S. F., Ando, T., Wirth, H. P., Tham, K. T., Camorlinga, M., Blaser, M. J., Falkow, S., and Peek, R. M., Jr. (2001). Helicobacter pylori strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J.Clin.Invest.* **107**, 611-620.
- Ito, T., Schaller, M., Hogaboam, C. M., Standiford, T. J., Chensue, S. W., and Kunkel, S. L. (2007). TLR9 activation is a key event for the maintenance of a mycobacterial antigen-elicited pulmonary granulomatous response. *Eur.J.Immunol.* **37**, 2847-2855.
- Ivory, C. P. and Chadee, K. (2007). Intranasal immunization with Gal-inhibitable lectin plus an adjuvant of CpG oligodeoxynucleotides protects against Entamoeba histolytica challenge. *Infection and Immunity* **75**, 4917-4922.
- Jarnjak-Jankovic, S., Saeboe-Larsen, S., Kvalheim, G., and Gaudernack, G. (2007). mRNA transfection of DC in the immature or mature state: comparable in vitro priming of Th and cytotoxic T lymphocytes against DC electroporated with tumor cell line-derived mRNA. *Cytotherapy*. **9**, 587-592.
- Jiang, W., Baker, H. J., and Smith, B. F. (2003). Mucosal immunization with helicobacter, CpG DNA, and cholera toxin is protective. *Infection and Immunity* **71**, 40-46.
- Jiang, X., Shen, C., Rey-Ladino, J., Yu, H., and Brunham, R. C. (2008). Characterization of murine dendritic cell line JAWS II and primary bone marrow-derived dendritic cells in Chlamydia muridarum antigen presentation and induction of protective immunity. *Infection and Immunity* **76**, 2392-2401.
- Jie, Z. J., Jin, M. L., Cai, Y. Y., Yuan, Z. H., Hu, Y. W., Xu, Y., Ren, T., and Yang, Z. H. (2006). [The effects of CpG-oligodeoxynucleotides on airway remodeling in chronic asthmatic mice]. *Zhonghua Jie.He.He.Hu Xi.Za Zhi.* **29**, 612-616.
- Jin, Z., Hu, F. L., Wei, H., Tang, X. Y., and Dong, Y. (2008). [Establishment of Mongolian gerbil model of long-term Helicobacter pylori infection]. *Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.* **88**, 1518-1522.
- Kalinski, P., Smits, H. H., Schuitemaker, J. H., Vieira, P. L., van Eijk, M., de Jong, E. C., Wierenga, E. A., and Kapsenberg, M. L. (2000). IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *J.Immunol.* **165**, 1877-1881.

- Kalinski, P., Urban, J., Narang, R., Berk, E., Wieckowski, E., and Muthuswamy, R. (2009). Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need. *Future.Oncol.* **5**, 379-390.
- Kang, J. M., Kim, N., Lee, D. H., Park, J. H., Lee, M. K., Kim, J. S., Jung, H. C., and Song, I. S. (2008). The Effects of Genetic Polymorphisms of IL-6, IL-8, and IL-10 on Helicobacter pylori-induced Gastroduodenal Diseases in Korea. *J.Clin.Gastroenterol.*
- Kapadia, D., Sadikovic, A., Vanloubbeeck, Y., Brockstedt, D., and Fong, L. (2011). Interplay between CD8alpha Dendritic Cells and Monocytes in Response to Listeria monocytogenes Infection Attenuates T Cell Responses. *PLoS.ONE.* **6**, e19376.
- Kassim, S. H., Rajasagi, N. K., Zhao, X., Chervenak, R., and Jennings, S. R. (2006). In vivo ablation of CD11c-positive dendritic cells increases susceptibility to herpes simplex virus type 1 infection and diminishes NK and T-cell responses. *J.Virol.* **80**, 3985-3993.
- Kato, M. and Asaka, M. (2010). Recent knowledge of the relationship between Helicobacter pylori and gastric cancer and recent progress of gastroendoscopic diagnosis and treatment for gastric cancer. *Jpn.J.Clin.Oncol.* **40**, 828-837.
- Kawashima, M. and Miossec, P. (2004). Decreased response to IL-12 and IL-18 of peripheral blood cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.Ther.* **6**, R39-R45.
- Kelsall, B. L. and Strober, W. (1996). Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *Journal of Experimental Medicine* **183**, 237-247.
- Kikuchi, T., Kobayashi, T., Gomi, K., Suzuki, T., Tokue, Y., Watanabe, A., and Nukiwa, T. (2004). Dendritic cells pulsed with live and dead Legionella pneumophila elicit distinct immune responses. *J.Immunol.* **172**, 1727-1734.
- Kim, S. and Voskuhl, R. R. (1999). Decreased IL-12 production underlies the decreased ability of male lymph node cells to induce experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.* **162**, 5561-5568.
- Kim, Y., So, H. S., Kim, S. J., Youn, M. J., Lee, J. H., Kim, N. S., Lee, J. H., Woo, W. H., Lee, D. W., Cho, K. H., Moon, B. S., and Park, R. (2008). Antiinflammatory effect of Daesihoo, a Korean traditional prescription for cerebral infarct patients. *Phytother.Res.* ..
- Kirchner, T., Muller, S., Hattori, T., Mukaisyo, K., Papadopoulos, T., Brabletz, T., and Jung, A. (2001). Metaplasia, intraepithelial neoplasia and early cancer of the stomach are related to dedifferentiated epithelial cells defined by cytokeratin-7 expression in gastritis. *Virchows Arch.* **439**, 512-522.
- Kivi, M. and Tindberg, Y. (2006). Helicobacter pylori occurrence and transmission: a family affair? *Scand.J.Infect.Dis.* **38**, 407-417.
- Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J., and Krieg, A. M. (1996). CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 2879-2883.
- Knuefermann, P., Baumgarten, G., Koch, A., Schwederski, M., Velten, M., Ehrentraut, H., Mersmann, J., Meyer, R., Hoeft, A., Zacharowski, K., and Grohe, C. (2007). CpG oligonucleotide activates Toll-like receptor 9 and causes lung inflammation in vivo. *Respir.Res.* **8**, 72.

Kobayashi, H., Kamiya, S., Suzuki, T., Kohda, K., Muramatsu, S., Kurumada, T., Ohta, U., Miyazawa, M., Kimura, N., Mutoh, N., Shirai, T., Takagi, A., Harasawa, S., Tani, N., and Miwa, T. (1996). The effect of *Helicobacter pylori* on gastric acid secretion by isolated parietal cells from a guinea pig. Association with production of vacuolating toxin by *H. pylori*. *Scand.J.Gastroenterol.* **31**, 428-433.

Kobayashi, Y. (2008). The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci.* **13**:2400-7., 2400-2407.

Koga, T., Duan, H., Moroi, Y., Urabe, K., and Furue, M. (2003). Activated and mature CD83-positive dendritic cells and interferon-gamma-positive cells in skin eruptions of secondary syphilis. *Acta Derm.Venereol.* **83**, 214-217.

Kohn, F. R. and Kung, A. H. (1995). Role of endotoxin in acute inflammation induced by gram-negative bacteria: specific inhibition of lipopolysaccharide-mediated responses with an amino-terminal fragment of bactericidal/permeability-increasing protein. *Infection and Immunity* **63**, 333-339.

Koido, S., Hara, E., Homma, S., Fujise, K., Gong, J., and Tajiri, H. (2007). Dendritic/tumor fusion cell-based vaccination against cancer. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)*. **55**, 281-287.

Krakowka, S., Morgan, D. R., Kraft, W. G., and Leunk, R. D. (1987). Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. *Infection and Immunity* **55**, 2789-2796.

Kranzer, K., Eckhardt, A., Aigner, M., Knoll, G., Deml, L., Speth, C., Lehn, N., Rehli, M., and Schneider-Brachert, W. (2004). Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* **72**, 4416-4423.

Kranzer, K., Sollner, L., Aigner, M., Lehn, N., Deml, L., Rehli, M., and Schneider-Brachert, W. (2005). Impact of *Helicobacter pylori* virulence factors and compounds on activation and maturation of human dendritic cells. *Infection and Immunity* **73**, 4180-4189.

Krieg, A. M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu.Rev.Immunol.* **20**, 709-760.

Kruger, C., Laage, R., Pitzer, C., Schabitz, W. R., and Schneider, A. (2007). The hematopoietic factor GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) promotes neuronal differentiation of adult neural stem cells in vitro. *BMC.Neurosci.* **8**:88., 88.

Kuck, D., Kolmerer, B., Iking-Konert, C., Krammer, P. H., Stremmel, W., and Rudi, J. (2001). Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infection and Immunity* **69**, 5080-5087.

Kudo, T., Nurgalieva, Z. Z., Conner, M. E., Crawford, S., Odenbreit, S., Haas, R., Graham, D. Y., and Yamaoka, Y. (2004). Correlation between *Helicobacter pylori* OipA protein expression and oipA gene switch status. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 2279-2281.

Kuipers, E. J. (1999). Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment.Pharmacol.Ther.* **13 Suppl 1**:3-11., 3-11.

Kuipers, E. J., Perez-Perez, G. I., Meuwissen, S. G., and Blaser, M. J. (1995a). *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the cagA status. *J.Natl.Cancer Inst.* **87**, 1777-1780.

- Kuipers, E. J., Uytterlinde, A. M., Pena, A. S., Roosendaal, R., Pals, G., Nelis, G. F., Festen, H. P., and Meuwissen, S. G. (1995b). Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet*. **345**, 1525-1528.
- Kuo, C. H., Hu, H. M., Tsai, P. Y., Yang, S. F., Chang, L. L., Wang, J. Y., Chen, A., Jan, C. M., Wang, W. M., and Wu, D. C. (2008). A better method for confirming *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J.Gastroenterol.* **43**, 32-37.
- Kuo, S. H., Chen, L. T., Chen, C. L., Doong, S. L., Yeh, K. H., Wu, M. S., Mao, T. L., Hsu, H. C., Wang, H. P., Lin, J. T., and Cheng, A. L. (2005). Expression of CD86 and increased infiltration of NK cells are associated with *Helicobacter pylori*-dependent state of early stage high-grade gastric MALT lymphoma. *World J.Gastroenterol.* **11**, 4357-4362.
- Kurnatowski, P. and Kurnatowska, A. J. (2010). [The immune response to fungal infections]. *Wiad.Parazytol.* **56**, 23-27.
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H., and Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews* **19**, 449-490.
- Kuwahara, H., Miyamoto, Y., Akaike, T., Kubota, T., Sawa, T., Okamoto, S., and Maeda, H. (2000). *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxynitrite via carbon dioxide production. *Infection and Immunity* **68**, 4378-4383.
- Ia Sala, A., He, J., Laricchia-Robbio, L., Gorini, S., Iwasaki, A., Braun, M., Yap, G. S., Sher, A., Ozato, K., and Kelsall, B. (2009). Cholera toxin inhibits IL-12 production and CD8alpha+ dendritic cell differentiation by cAMP-mediated inhibition of IRF8 function. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 1227-1235.
- Lambert, J. R., Borromeo, M., Pinkard, K. J., Turner, H., Chapman, C. B., and Smith, M. L. (1987). Colonization of gnotobiotic piglets with *Campylobacter Pyloridis*--an animal model? *J.Infect.Dis.* **155**, 1344.
- Lee, J. B., Jang, J. E., Song, M. K., and Chang, J. (2009). Intranasal delivery of cholera toxin induces th17-dominated T-cell response to bystander antigens. *PLoS.ONE.* **4**, e5190.
- Lehours, P. and Yilmaz, O. (2007). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* **12 Suppl 1:1-3.**, 1-3.
- Lehrnbecher, T., Koehl, U., Wittekindt, B., Bochennek, K., Tramsen, L., Klingebiel, T., and Chanock, S. J. (2008). Changes in host defence induced by malignancies and antineoplastic treatment: implication for immunotherapeutic strategies. *Lancet Oncol.* **9**, 269-278.
- Li, G. Q., Xia, H. H., Chen, M. H., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Gu, Q., Qiao, L., Cho, C. H., So, W. H., Yuen, M. F., Hu, P. J., Liang, Y. J., Lin, H. L., Chan, A. O., and Wong, B. C. (2008). Effects of aspirin on the development of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and heterotopic proliferative glands in Mongolian gerbils. *Helicobacter.* **13**, 20-29.
- Lindholm, C., Quiding-Jarbrink, M., Lonroth, H., Hamlet, A., and Svennerholm, A. M. (1998). Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infection and Immunity* **66**, 5964-5971.
- Liu, L. N., Shivakumar, R., Allen, C., and Frattantoni, J. C. (2008a). Delivery of whole tumor lysate into dendritic cells for cancer vaccination. *Methods Mol.Biol.* **423**, 139-153.

Liu, T., Nerren, J., Liu, M., Martens, R., and Cohen, N. (2008b). Basal and stimulus-induced cytokine expression is selectively impaired in peripheral blood mononuclear cells of newborn foals. *Vaccine*.

Lu, L., Woo, J., Rao, A. S., Li, Y., Watkins, S. C., Qian, S., Starzl, T. E., Demetris, A. J., and Thomson, A. W. (1994). Propagation of dendritic cell progenitors from normal mouse liver using granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and their maturational development in the presence of type-1 collagen. *Journal of Experimental Medicine* **179**, 1823-1834.

Ludewig, B. (2003). Dendritic cell vaccination and viral infection--animal models. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **276:199-214.**, 199-214.

Luhr, K. M., Nordstrom, E. K., Low, P., Ljunggren, H. G., Taraboulos, A., and Kristensson, K. (2004). Scrapie protein degradation by cysteine proteases in CD11c+ dendritic cells and GT1-1 neuronal cells. *J.Virol.* **78**, 4776-4782.

Lundgren, A., Trollmo, C., Edebo, A., Svennerholm, A. M., and Lundin, B. S. (2005). Helicobacter pylori-specific CD4+ T cells home to and accumulate in the human Helicobacter pylori-infected gastric mucosa. *Infection and Immunity* **73**, 5612-5619.

Luo, Y. H., Yan, J., and Mao, Y. F. (2004). Helicobacter pylori lipopolysaccharide: biological activities in vitro and in vivo, pathological correlation to human chronic gastritis and peptic ulcer. *World J.Gastroenterol.* **10**, 2055-2059.

Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J.Immunol.Methods.* **223**, 77-92.

Maeda, S. and Mentis, A. F. (2007). Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter.* **12 Suppl 1**, 10-14.

Mahler, M., Bedigian, H. G., Burgett, B. L., Bates, R. J., Hogan, M. E., and Sundberg, J. P. (1998). Comparison of four diagnostic methods for detection of Helicobacter species in laboratory mice. *Lab Anim Sci.* **48**, 85-91.

Mai, Z., Kousoulas, K. G., Horohov, D. W., and Klei, T. R. (1994). Cross-species PCR cloning of gerbil (Meriones unguiculatus) interleukin-2 cDNA and its expression in COS-7 cells. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **40**, 63-71.

Marchetti, M., Arico, B., Burrone, D., Figura, N., Rappuoli, R., and Ghiara, P. (1995). Development of a mouse model of Helicobacter pylori infection that mimics human disease. *Science* **267**, 1655-1658.

Marinero, M., Staats, H. F., Hiroi, T., Jackson, R. J., Coste, M., Boyaka, P. N., Okahashi, N., Yamamoto, M., Kiyono, H., and Bluethmann, H. (1995). Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4. *J.Immunol.* **155**, 4621-4629.

Marshall, B. (2006). Commentary: a unifying mathematical hypothesis for the epidemiology of Helicobacter-associated diseases--plurality should not be assumed without necessity. *Int.J.Epidemiol.* **35**, 1097-1098.

Marshall, B. J. and Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**, 1311-1315.



Martin, H. R., Shakya, K. P., Muthupalani, S., Ge, Z., Klei, T. R., Whary, M. T., and Fox, J. G. (2010). *Brugia filariasis* differentially modulates persistent *Helicobacter pylori* gastritis in the gerbil model. *Microbes.Infect.* **12**, 748-758.

Matsumoto, S., Washizuka, Y., Matsumoto, Y., Tawara, S., Ikeda, F., Yokota, Y., and Karita, M. (1997). Induction of ulceration and severe gastritis in Mongolian gerbil by *Helicobacter pylori* infection. *J.Med.Microbiol.* **46**, 391-397.

Mattapallil, J. J., Dandekar, S., Canfield, D. R., and Solnick, J. V. (2000). A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques. *Gastroenterology* **118**, 307-315.

McCormick, S., Santosuosso, M., Small, C. L., Shaler, C. R., Zhang, X., Jeyanathan, M., Mu, J., Takenaka, S., Ngai, P., Gauldie, J., Wan, Y., and Xing, Z. (2008). Mucosally delivered dendritic cells activate T cells independently of IL-12 and endogenous APCs. *J.Immunol.* **181**, 2356-2367.

Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat.Rev.immunol.* **1**, 135-145.

Mellman, I. and Steinman, R. M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* **106**, 255-258.

Mendall, M. A., Goggin, P. M., Molineaux, N., Levy, J., Toosy, T., Strachan, D., and Northfield, T. C. (1992). Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. *Lancet* **339**, 896-897.

Merrick, A., Diaz, R. M., O'Donnell, D., Selby, P., Vile, R., and Melcher, A. (2008). Autologous versus allogeneic peptide-pulsed dendritic cells for anti-tumour vaccination: expression of allogeneic MHC supports activation of antigen specific T cells, but impairs early naive cytotoxic priming and anti-tumour therapy. *Cancer Immunol.Immunother.* **57**, 897-906.

Meyer, F., Wilson, K. T., and James, S. P. (2000). Modulation of innate cytokine responses by products of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* **68**, 6265-6272.

Michelsen, K. S., Wong, M. H., Shah, P. K., Zhang, W., Yano, J., Doherty, T. M., Akira, S., Rajavashisth, T. B., and Arditi, M. (2004). Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101**, 10679-10684.

Michiels, A., Tuyaerts, S., Bonehill, A., Heirman, C., Corthals, J., and Thielemans, K. (2008). Delivery of tumor-antigen-encoding mRNA into dendritic cells for vaccination. *Methods Mol.Biol.* **423:155-63.**, 155-163.

Miller, M. J., Hejazi, A. S., Wei, S. H., Cahalan, M. D., and Parker, I. (2004). T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101**, 998-1003.

Mitchell, P., Germain, C., Fiori, P. L., Khamri, W., Foster, G. R., Ghosh, S., Lechler, R. I., Bamford, K. B., and Lombardi, G. (2007). Chronic exposure to *Helicobacter pylori* impairs dendritic cell function and inhibits Th1 development. *Infection and Immunity* **75**, 810-819.

Moese, S., Selbach, M., Kwok, T., Brinkmann, V., Konig, W., Meyer, T. F., and Backert, S. (2004). *Helicobacter pylori* induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways. *Infection and Immunity* **72**, 3646-3649.

- Molinari, M., Salio, M., Galli, C., Norais, N., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A., and Montecucco, C. (1998). Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *Journal of Experimental Medicine* **187**, 135-140.
- Morandi, B., Agazzi, A., D'Agostino, A., Antonini, F., Costa, G., Sabatini, F., Ferlazzo, G., and Melioli, G. (2011). A mixture of bacterial mechanical lysates is more efficient than single strain lysate and of bacterial-derived soluble products for the induction of an activating phenotype in human dendritic cells. *Immunol.Lett.*
- Moss, S. F. and Malfertheiner, P. (2007). *Helicobacter* and gastric malignancies. *Helicobacter*. **12 Suppl 1:23-30.**, 23-30.
- Moujaber, T., Macintyre, C. R., Backhouse, J., Gidding, H., Quinn, H., and Gilbert, G. L. (2008). The seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Australia. *Int.J.Infect.Dis.* ..
- Murphy, K. M. and Reiner, S. L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat.Rev.immunol.* **2**, 933-944.
- Nagai, S., Mimuro, H., Yamada, T., Baba, Y., Moro, K., Nochi, T., Kiyono, H., Suzuki, T., Sasakawa, C., and Koyasu, S. (2007). Role of Peyer's patches in the induction of *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **104**, 8971-8976.
- Naito, Y., Takagi, T., Okada, H., Nukigi, Y., Uchiyama, K., Kuroda, M., Handa, O., Kokura, S., Yagi, N., Kato, Y., Osawa, T., and Yoshikawa, T. (2008). Expression of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide-modified proteins in *Helicobacter pylori*-associated atrophic gastric mucosa. *J.Gastroenterol.Hepatol.* **23 Suppl 2:S250-7.**, S250-S257.
- Naumann, M., Wessler, S., Bartsch, C., Wieland, B., Covacci, A., Haas, R., and Meyer, T. F. (1999). Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the *cag* pathogenicity island. *J.Biol.Chem.* **274**, 31655-31662.
- Nayak, J. V., Hokey, D. A., Larregina, A., He, Y., Salter, R. D., Watkins, S. C., and Falo, L. D., Jr. (2006). Phagocytosis induces lysosome remodeling and regulated presentation of particulate antigens by activated dendritic cells. *J.Immunol.* **177**, 8493-8503.
- Nedrud, J. G. (1999). Animal models for gastric *Helicobacter* immunology and vaccine studies. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **24**, 243-250.
- Nedrud, J. G. (2001). *Helicobacter pylori* vaccines: lessons from small animal models. *Scand.J.Immunol.* **53**, 429-436.
- Nedrud, J. G. and Blanchard, T. G. (2001). *Helicobacter* animal models. *Curr.Protoc.Immunol.* **Chapter 19**, Unit.
- Neu, B., Randlkofer, P., Neuhofer, M., Volland, P., Mayerhofer, A., Gerhard, M., Schepp, W., and Prinz, C. (2002). *Helicobacter pylori* induces apoptosis of rat gastric parietal cells. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol.* **283**, G309-G318.
- Nikolic, T., de Bruijn, M. F., Lutz, M. B., and Leenen, P. J. (2003). Developmental stages of myeloid dendritic cells in mouse bone marrow. *Int.Immunol.* **15**, 515-524.
- Nishihira, J. (2000). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth. *J.Interferon Cytokine Res.* **20**, 751-762.

- Nozaki, K., Tanaka, H., Ikehara, Y., Cao, X., Nakanishi, H., Azuma, T., Yamazaki, S., Yamaoka, Y., Shimizu, N., Mafune, K., Kaminishi, M., and Tatematsu, M. (2005). Helicobacter pylori-dependent NF-kappa B activation in newly established Mongolian gerbil gastric cancer cell lines. *Cancer Sci.* **96**, 170-175.
- Nystrom-Asklin, J., Adamsson, J., and Harandi, A. M. (2008). The adjuvant effect of CpG oligodeoxynucleotide linked to the non-toxic B subunit of cholera toxin for induction of immunity against H. pylori in mice. *Scand.J.Immunol.* **67**, 431-440.
- O'Keeffe, J. and Moran, A. P. (2008). Conventional, regulatory, and unconventional T cells in the immunologic response to Helicobacter pylori. *Helicobacter.* **13**, 1-19.
- Obonyo, M., Cole, S. P., Datta, S. K., and Guiney, D. G. (2006). Evidence for interleukin-1-independent stimulation of interleukin-12 and down-regulation by interleukin-10 in Helicobacter pylori-infected murine dendritic cells deficient in the interleukin-1 receptor. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **47**, 414-419.
- Obonyo, M., Guiney, D. G., Harwood, J., Fierer, J., and Cole, S. P. (2002). Role of gamma interferon in Helicobacter pylori induction of inflammatory mediators during murine infection. *Infection and Immunity* **70**, 3295-3299.
- Obonyo, M., Sabet, M., Cole, S. P., Ebmeyer, J., Uematsu, S., Akira, S., and Guiney, D. G. (2007). Deficiencies of myeloid differentiation factor 88, Toll-like receptor 2 (TLR2), or TLR4 produce specific defects in macrophage cytokine secretion induced by Helicobacter pylori. *Infection and Immunity* **75**, 2408-2414.
- Odenbreit, S., Gebert, B., Puls, J., Fischer, W., and Haas, R. (2001). Interaction of Helicobacter pylori with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell Microbiol.* **3**, 21-31.
- Odenbreit, S., Linder, S., Gebert-Vogl, B., Rieder, G., Moran, A. P., and Haas, R. (2006). Interleukin-6 induction by Helicobacter pylori in human macrophages is dependent on phagocytosis. *Helicobacter.* **11**, 196-207.
- Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., and Haas, R. (2000). Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* **287**, 1497-1500.
- Oderda, G., Vivenza, D., Rapa, A., Boldorini, R., Bonsignori, I., and Bona, G. (2007). Increased interleukin-10 in Helicobacter pylori infection could be involved in the mechanism protecting from allergy. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* **45**, 301-305.
- Ogawa, Y., Duru, E. A., and Ameredes, B. T. (2008). Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. *Curr.Mol.Med.* **8**, 437-445.
- Ogura, K., Maeda, S., Nakao, M., Watanabe, T., Tada, M., Kyutoku, T., Yoshida, H., Shiratori, Y., and Omata, M. (2000). Virulence factors of Helicobacter pylori responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 1601-1610.
- Ohkusa, T., Okayasu, I., Miwa, H., Ohtaka, K., Endo, S., and Sato, N. (2003). Helicobacter pylori infection induces duodenitis and superficial duodenal ulcer in Mongolian gerbils. *Gut.* **52**, 797-803.
- Orabona, C., Grohmann, U., Belladonna, M. L., Fallarino, F., Vacca, C., Bianchi, R., Bozza, S., Volpi, C., Salomon, B. L., Fioretti, M. C., Romani, L., and Puccetti, P. (2004).

CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nat.Immunol.* **5**, 1134-1142.

Osawa, H., Sugano, K., Iwamori, M., Kawakami, M., Tada, M., and Nakao, M. (2001). Comparative analysis of colonization of *Helicobacter pylori* and glycolipids receptor density in Mongolian gerbils and mice. *Dig.Dis.Sci.* **46**, 69-74.

Otaka, M., Konishi, N., Odashima, M., Jin, M., Wada, I., Matsushashi, T., Horikawa, Y., Ohba, R., and Watanabe, S. (2006). Is Mongolian gerbil really adequate host animal for study of *Helicobacter pylori* infection-induced gastritis and cancer? *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **347**, 297-300.

Palucka, A. K., Ueno, H., Fay, J. W., and Banchereau, J. (2007). Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol.Rev.* **220:129-50.**, 129-150.

Panthei, K., Faller, G., and Haas, R. (2003). Colonization of C57BL/6J and BALB/c wild-type and knockout mice with *Helicobacter pylori*: effect of vaccination and implications for innate and acquired immunity. *Infection and Immunity* **71**, 794-800.

Parihar, R., Dierksheide, J., Hu, Y., and Carson, W. E. (2002). IL-12 enhances the natural killer cell cytokine response to Ab-coated tumor cells. *J.Clin.Invest.* **110**, 983-992.

Park, J. H., Seok, S. H., Baek, M. W., Lee, H. Y., Kim, D. J., and Park, J. H. (2008). Gastric lesions and immune responses caused by long-term infection with *Helicobacter heilmannii* in C57BL/6 mice. *J.Comp Pathol.* **139**, 208-217.

Parsonnet, J. and Isaacson, P. G. (2004). Bacterial infection and MALT lymphoma. *N.Engl.J.Med.* **350**, 213-215.

Patel, B. A., Gomis, S., Dar, A., Willson, P. J., Babiuk, L. A., Potter, A., Mutwiri, G., and Tikoo, S. K. (2008). Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs (CpG-ODN) predominantly induce Th1-type immune response in neonatal chicks. *Dev.Comp Immunol.*

Pellicano, A., Sebkova, L., Monteleone, G., Guarnieri, G., Imeneo, M., Pallone, F., and Luzzza, F. (2007). Interleukin-12 drives the Th1 signaling pathway in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Infection and Immunity* **75**, 1738-1744.

Perez-Perez, G. I., Rothenbacher, D., and Brenner, H. (2004). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* **9 Suppl 1:1-6.**, 1-6.

Perfetto, B., Buommino, E., Canozo, N., Paoletti, I., Corrado, F., Greco, R., and Donnarumma, G. (2004). Interferon-gamma cooperates with *Helicobacter pylori* to induce iNOS-related apoptosis in AGS gastric adenocarcinoma cells. *Res.Microbiol.* **155**, 259-266.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* **282**, 2085-2088.

Prechtel, A. T. and Steinkasserer, A. (2007a). CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch.Dermatol.Res.* **299**, 59-69.

Prechtel, A. T., Turza, N. M., Theodoridis, A. A., and Steinkasserer, A. (2007b). CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation. *J.Immunol.* **178**, 5454-5464.

- Prinz, C., Hafsi, N., and Volland, P. (2003). Helicobacter pylori virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends Microbiol.* **11**, 134-138.
- Pun, P. B., Bhat, A. A., Mohan, T., Kulkarni, S., Paranjape, R., and Rao, D. N. (2009). Intranasal administration of peptide antigens of HIV with mucosal adjuvant CpG ODN coentrapped in microparticles enhances the mucosal and systemic immune responses. *Int.Immunopharmacol.* **9**, 468-477.
- Qu, W., Zhou, Y., Shao, C., Sun, Y., Zhang, Q., Chen, C., and Jia, J. (2009). Helicobacter pylori proteins response to nitric oxide stress. *J.Microbiol.* **47**, 486-493.
- Queralt, N. and Araujo, R. (2007). Analysis of the survival of H. pylori within a laboratory-based aquatic model system using molecular and classical techniques. *Microb.Ecol.* **54**, 771-777.
- Rabelo-Goncalves, E. M., Nishimura, N. F., and Zeitune, J. M. (2005). Development of a BALB/c mouse model of Helicobacter pylori infection with fresh and frozen bacteria. *Biol.Res.* **38**, 101-109.
- Rad, R., Ballhorn, W., Volland, P., Eisenacher, K., Mages, J., Rad, L., Ferstl, R., Lang, R., Wagner, H., Schmid, R. M., Bauer, S., Prinz, C., Kirschning, C. J., and Krug, A. (2009). Extra- and Intracellular Pattern Recognition Receptors Cooperate in the Recognition of Helicobacter pylori. *Gastroenterology*.
- Rad, R., Brenner, L., Krug, A., Volland, P., Mages, J., Lang, R., Schwendy, S., Reindl, W., Dossumbekova, A., Ballhorn, W., Wagner, H., Schmid, R. M., Bauer, S., and Prinz, C. (2007). Toll-like receptor-dependent activation of antigen-presenting cells affects adaptive immunity to Helicobacter pylori. *Gastroenterology*. **133**, 150-163.
- Radin, M. J., Eaton, K. A., Krakowka, S., Morgan, D. R., Lee, A., Otto, G., and Fox, J. (1990). Helicobacter pylori gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. *Infection and Immunity* **58**, 2606-2612.
- Remer, K. A., Apetrei, C., Schwarz, T., Linden, C., and Moll, H. (2007). Vaccination with plasmacytoid dendritic cells induces protection against infection with Leishmania major in mice. *Eur.J.Immunol.* **37**, 2463-2473.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat.Immunol.* **2**, 361-367.
- Rieder, G., Karnholz, A., Stoeckelhuber, M., Merchant, J. L., and Haas, R. (2007). H pylori infection causes chronic pancreatitis in Mongolian gerbils. *World J.Gastroenterol.* **13**, 3939-3947.
- Roda, J. M., Parihar, R., and Carson, W. E., III (2005). CpG-containing oligodeoxynucleotides act through TLR9 to enhance the NK cell cytokine response to antibody-coated tumor cells. *J.Immunol.* **175**, 1619-1627.
- Rogers, T. J. CXC Chemokine Responses of Intestinal Epithelial Cells to Shiga-toxigenic Escherichia coli. 2004. Department of Molecular and Biomedical Sciences.  
Ref Type: Thesis/Dissertation

Röhl, J. Analyse der *Helicobacter pylori*-induzierten Gastritis im Infektionsmodell von *Meriones unguiculatus*. 1-8-2005. Naturwissenschaftliche Fakultät III.  
Ref Type: Thesis/Dissertation

Romani, N. and Schuler, G. (1992). The immunologic properties of epidermal Langerhans cells as a part of the dendritic cell system. *Springer Semin.Immunopathol.* **13**, 265-279.

Rossi, M., Hanninen, M. L., Revez, J., Hannula, M., and Zanoni, R. G. (2007). Occurrence and species level diagnostics of *Campylobacter* spp., enteric *Helicobacter* spp. and *Anaerobiospirillum* spp. in healthy and diarrheic dogs and cats. *Vet.Microbiol.* ..

Rossner, S., Voigtlander, C., Wiethe, C., Hanig, J., Seifarth, C., and Lutz, M. B. (2005). Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *Eur.J.Immunol.* **35**, 3533-3544.

Rothenbacher, D., Bode, G., Berg, G., Knayer, U., Gonser, T., Adler, G., and Brenner, H. (1999). *Helicobacter pylori* among preschool children and their parents: evidence of parent-child transmission. *J.Infect.Dis.* **179**, 398-402.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning - A Laboratory Manual." Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Sanders, C. J., Yu, Y., Moore, D. A., III, Williams, I. R., and Gewirtz, A. T. (2006). Humoral immune response to flagellin requires T cells and activation of innate immunity. *J.Immunol.* **177**, 2810-2818.

Santin, A. D., Bellone, S., Palmieri, M., Zanolini, A., Ravaggi, A., Siegel, E. R., Roman, J. J., Pecorelli, S., and Cannon, M. J. (2008). Human papillomavirus type 16 and 18 E7-pulsed dendritic cell vaccination of stage IB or IIA cervical cancer patients: a phase I escalating-dose trial. *J.Virol.* **82**, 1968-1979.

Sas, S., Chan, T., Sami, A., El Gayed, A., and Xiang, J. (2008). Vaccination of fiber-modified adenovirus-transfected dendritic cells to express HER-2/neu stimulates efficient HER-2/neu-specific humoral and CTL responses and reduces breast carcinogenesis in transgenic mice. *Cancer Gene Ther.* ..

Sauma, D., Espejo, P., Ramirez, A., Fierro, A., Roseblatt, M., and Bono, M. R. (2011). Differential regulation of Notch ligands in dendritic cells upon interaction with T helper cells. *Scand.J.Immunol.*

Sawai, N., Kita, M., Kodama, T., Tanahashi, T., Yamaoka, Y., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Imanishi, J. (1999). Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infection and Immunity* **67**, 279-285.

Sayi, A., Kohler, E., Toller, I. M., Flavell, R. A., Muller, W., Roers, A., and Muller, A. (2011). TLR-2-activated B cells suppress *Helicobacter*-induced preneoplastic gastric immunopathology by inducing T regulatory-1 cells. *J.Immunol.* **186**, 878-890.

Schaefer, T. M., Desouza, K., Fahey, J. V., Beagley, K. W., and Wira, C. R. (2004). Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. *Immunology.* **112**, 428-436.

Schmausser, B., Andrusis, M., Endrich, S., Lee, S. K., Josenhans, C., Muller-Hermelink, H. K., and Eck, M. (2004). Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin.Exp.Immunol.* **136**, 521-526.

- Schmausser, B., Andrulis, M., Endrich, S., Muller-Hermelink, H. K., and Eck, M. (2005). Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *Int.J.Med.Microbiol.* **295**, 179-185.
- Schreiber, S., Konradt, M., Groll, C., Scheid, P., Hanauer, G., Werling, H. O., Josenhans, C., and Suerbaum, S. (2004). The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101**, 5024-5029.
- Schroder, K., Lichtinger, M., Irvine, K. M., Brion, K., Trieu, A., Ross, I. L., Ravasi, T., Stacey, K. J., Rehli, M., Hume, D. A., and Sweet, M. J. (2007). PU.1 and ICSBP control constitutive and IFN-gamma-regulated Tlr9 gene expression in mouse macrophages. *J.Leukoc.Biol.* **81**, 1577-1590.
- Schütz, C. Analyse der *Helicobacter pylori*-abhängigen Zytokin-Induktion im naiven Maus-Splenozytenmodell. 2004. Naturwissenschaftliche Fakultät III, Biologie und Vorklinische Medizin.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Segal, E. D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., and Tompkins, L. S. (1999). Altered states: Involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 14559-14564.
- Selbach, M., Moese, S., Backert, S., Jungblut, P. R., and Meyer, T. F. (2004). The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin. *Proteomics.* **4**, 2961-2968.
- Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C. R., Meyer, T. F., and Backert, S. (2003). The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J.* **22**, 515-528.
- Servida, F., Soligo, D., and Lambertenghi, D. G. (2000). Functional differences between dendritic cells derived from CD34+ bone marrow and peripheral blood stem cells. *Haematologica* **85**, 352-355.
- Shi, T., Liu, W. Z., Gao, F., Shi, G. Y., and Xiao, S. D. (2005). Intranasal CpG-oligodeoxynucleotide is a potent adjuvant of vaccine against *Helicobacter pylori*, and T helper 1 type response and interferon-gamma correlate with the protection. *Helicobacter.* **10**, 71-79.
- Shibata, W., Hirata, Y., Maeda, S., Ogura, K., Ohmae, T., Yanai, A., Mitsuno, Y., Yamaji, Y., Okamoto, M., Yoshida, H., Kawabe, T., and Omata, M. (2006). CagA protein secreted by the intact type IV secretion system leads to gastric epithelial inflammation in the Mongolian gerbil model. *J.Pathol.* **210**, 306-314.
- Shih, Y. T., Wu, D. C., Liu, C. M., Yang, Y. C., Chen, I. J., and Lo, Y. C. (2007). San-Huang-Xie-Xin-Tang inhibits *Helicobacter pylori*-induced inflammation in human gastric epithelial AGS cells. *J.Ethnopharmacol.* **112**, 537-544.
- Shu, S., Zheng, R., Lee, W. T., and Cohen, P. A. (2007). Immunogenicity of dendritic-tumor fusion hybrids and their utility in cancer immunotherapy. *Crit Rev.Immunol.* **27**, 463-483.
- Smith, M. F., Jr., Mitchell, A., Li, G., Ding, S., Fitzmaurice, A. M., Ryan, K., Crowe, S., and Goldberg, J. B. (2003). Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J.Biol.Chem.* **278**, 32552-32560.

Smits, H. H., Gloudemans, A. K., van Nimwegen, M., Willart, M. A., Soullie, T., Muskens, F., de Jong, E. C., Boon, L., Pilette, C., Johansen, F. E., Hoogsteden, H. C., Hammad, H., and Lambrecht, B. N. (2009). Cholera toxin B suppresses allergic inflammation through induction of secretory IgA. *Mucosal Immunol.*

Smoot, D. T. (1997). How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct mechanisms. *Gastroenterology*. **113**, S31-S34.

Smythies, L. E., Waites, K. B., Lindsey, J. R., Harris, P. R., Ghiara, P., and Smith, P. D. (2000). *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. *J. Immunol.* **165**, 1022-1029.

Solnick, J. V. (2003). Clinical significance of *Helicobacter* species other than *Helicobacter pylori*. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 349-354.

Sommer, F., Wilken, H., Faller, G., and Lohoff, M. (2004). Systemic Th1 immunization of mice against *Helicobacter pylori* infection with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants does not protect from infection but enhances gastritis. *Infection and Immunity* **72**, 1029-1035.

Son, Y. I., Egawa, S., Tatsumi, T., Redlinger, R. E., Jr., Kalinski, P., and Kanto, T. (2002). A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *J. Immunol. Methods* **262**, 145-157.

Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:271-96., 271-296.

Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine* **137**, 1142-1162.

Sterzenbach, T., Lee, S. K., Brenneke, B., von Goetz, F., Schauer, D. B., Fox, J. G., Suerbaum, S., and Josenhans, C. (2007). Inhibitory effect of enterohepatic *Helicobacter hepaticus* on innate immune responses of mouse intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity* **75**, 2717-2728.

Sundrud, M. S., Torres, V. J., Unutmaz, D., and Cover, T. L. (2004). Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 7727-7732.

Szabolcs, P., Park, K. D., Reese, M., Marti, L., Broadwater, G., and Kurtzberg, J. (2003). Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood, and peripheral blood enumerated by a novel method. *Stem Cells* **21**, 296-303.

Takahashi, S., Keto, Y., Fujita, H., Muramatsu, H., Nishino, T., and Okabe, S. (1998). Pathological changes in the formation of *Helicobacter pylori*-induced gastric lesions in Mongolian gerbils. *Dig. Dis. Sci.* **43**, 754-765.

Takaishi, S. and Wang, T. C. (2007). Gene expression profiling in a mouse model of *Helicobacter*-induced gastric cancer. *Cancer Sci.* **98**, 284-293.

Takano, K., Kojima, T., Go, M., Murata, M., Ichimiya, S., Himi, T., and Sawada, N. (2005). HLA-DR- and CD11c-positive dendritic cells penetrate beyond well-developed epithelial tight junctions in human nasal mucosa of allergic rhinitis. *J. Histochem. Cytochem.* **53**, 611-619.



- Takata, T., Aras, R., Tavakoli, D., Ando, T., Olivares, A. Z., and Blaser, M. J. (2002). Phenotypic and genotypic variation in methylases involved in type II restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.* **30**, 2444-2452.
- Tan, M. P., Pedersen, J., Zhan, Y., Lew, A. M., Pearce, M. J., Wijburg, O. L., and Strugnell, R. A. (2008). CD8+ T cells are associated with severe gastritis in *Helicobacter pylori*-infected mice in the absence of CD4+ T cells. *Infection and Immunity* **76**, 1289-1297.
- Tatematsu, M., Tsukamoto, T., and Toyoda, T. (2007). Effects of eradication of *Helicobacter pylori* on gastric carcinogenesis in experimental models. *J.Gastroenterol.* **42 Suppl 17:7-9**, 7-9.
- Taylor, D. N. and Parsonnet, J. (1995). Epidemiology and natural history of *H. pylori* infections. In "Infections of the gastrointestinal tract" (M. J. Blaser, P. F. Smith, J. Ravdin, H. Greenberg, and R. L. Guerrant, Eds.), pp. 551-564. Raven Press, New York.
- Taylor, J. M., Ziman, M. E., Canfield, D. R., Vajdy, M., and Solnick, J. V. (2008). Effects of a Th1- versus a Th2-biased immune response in protection against *Helicobacter pylori* challenge in mice. *Microb.Pathog.* **44**, 20-27.
- Taylor, J. M., Ziman, M. E., Huff, J. L., Moroski, N. M., Vajdy, M., and Solnick, J. V. (2006). *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide promotes a Th1 type immune response in immunized mice. *Vaccine.* **24**, 4987-4994.
- Terebiznik, M. R., Vazquez, C. L., Torbicki, K., Banks, D., Wang, T., Hong, W., Blanke, S. R., Colombo, M. I., and Jones, N. L. (2006). *Helicobacter pylori* VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. *Infection and Immunity* **74**, 6599-6614.
- Theiner, G., Rossner, S., Dalpke, A., Bode, K., Berger, T., Gessner, A., and Lutz, M. B. (2008). TLR9 cooperates with TLR4 to increase IL-12 release by murine dendritic cells. *Mol.Immunol.* **45**, 244-252.
- Tong, X. M., Jin, J., Qian, W. B., Meng, H. T., and Xue, Y. Q. (2005). [Biological features of dendritic cells derived from chronic myeloid leukemia cells in vitro]. *Zhejiang.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban.* **34**, 348-52, 357.
- Toyoda, T., Tsukamoto, T., Hirano, N., Mizoshita, T., Kato, S., Takasu, S., Ban, H., and Tatematsu, M. (2008). Synergistic upregulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in gastric mucosa of Mongolian gerbils by a high-salt diet and *Helicobacter pylori* infection. *Histol.Histopathol.* **23**, 593-599.
- Treiber, G. and Lambert, J. R. (1998). The impact of *Helicobacter pylori* eradication on peptic ulcer healing. *Am.J.Gastroenterol.* **93**, 1080-1084.
- Trinchieri, G. (1997). Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Curr.Opin.Immunol.* **9**, 17-23.
- Tsukamoto, T., Mizoshita, T., and Tatematsu, M. (2007). Animal models of stomach carcinogenesis. *Toxicol.Pathol.* **35**, 636-648.
- Tsutsumi, R., Higashi, H., Higuchi, M., Okada, M., and Hatakeyama, M. (2003). Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J.Biol.Chem.* **278**, 3664-3670.

- Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaishi, S., Kurt-Jones, E. A., Rickman, B., Betz, K. S., Penz-Oesterreicher, M., Bjorkdahl, O., Fox, J. G., and Wang, T. C. (2008). Overexpression of interleukin-1 $\beta$  induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell*. **14**, 408-419.
- Tucci, M., Quatraro, C., Dammacco, F., and Silvestris, F. (2007). Increased IL-18 production by dendritic cells in active inflammatory myopathies. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1107:184-92.**, 184-192.
- Tummuru, M. K., Cover, T. L., and Blaser, M. J. (1993). Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infection and Immunity* **61**, 1799-1809.
- Underhill, D. M. and Ozinsky, A. (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr.Opin.Immunol.* **14**, 103-110.
- Uno, K., Kato, K., Atsumi, T., Suzuki, T., Yoshitake, J., Morita, H., Ohara, S., Kotake, Y., Shimosegawa, T., and Yoshimura, T. (2007). Toll-like receptor (TLR) 2 induced through TLR4 signaling initiated by *Helicobacter pylori* cooperatively amplifies iNOS induction in gastric epithelial cells. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol.* **293**, G1004-G1012.
- Utaisincharoen, P., Anuntagool, N., Arjcharoen, S., Limposuwan, K., Chaisuriya, P., and Sirisinha, S. (2004). Induction of iNOS expression and antimicrobial activity by interferon (IFN)- $\beta$  is distinct from IFN- $\gamma$  in *Burkholderia pseudomallei*-infected mouse macrophages. *Clin.Exp.Immunol.* **136**, 277-283.
- van de Loosdrecht, A. A., van den, A. W., Houtenbos, I., Ossenkoppele, G. J., and Westers, T. M. (2009). Dendritic cell-based immunotherapy in myeloid leukaemia: translating fundamental mechanisms into clinical applications. *Handb.Exp.Pharmacol.* 319-348.
- van der Hulst, R. W., Rauws, E. A., Koycu, B., Keller, J. J., ten Kate, F. J., Dankert, J., Tytgat, G. N., and van der, E. A. (1997). *Helicobacter pylori* reinfection is virtually absent after successful eradication. *J.Infect.Dis.* **176**, 196-200.
- van Doorn, L. J., Figueiredo, C., Sanna, R., Blaser, M. J., and Quint, W. G. (1999). Distinct variants of *Helicobacter pylori* cagA are associated with vacA subtypes. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 2306-2311.
- van Vliet, A. H., Kuipers, E. J., Waidner, B., Davies, B. J., de Vries, N., Penn, C. W., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Kist, M., Bereswill, S., and Kusters, J. G. (2001). Nickel-responsive induction of urease expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level. *Infection and Immunity* **69**, 4891-4897.
- Veldhuyzen van Zanten, S. J. and Sherman, P. M. (1994). *Helicobacter pylori* infection as a cause of gastritis, duodenal ulcer, gastric cancer and nonulcer dyspepsia: a systematic overview. *CMAJ.* **150**, 177-185.
- Wada, A., Yamasaki, E., and Hirayama, T. (2004). *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA, is responsible for gastric ulceration. *J.Biochem.* **136**, 741-746.
- Waghray, M., Zavros, Y., Saqui-Salces, M., El Zaatari, M., Alamelumangapuram, C. B., Todisco, A., Eaton, K. A., and Merchant, J. L. (2010). Interleukin-1 $\beta$  promotes gastric atrophy through suppression of Sonic Hedgehog. *Gastroenterology* **138**, 562-72, 572.

- Wang, J., Brooks, E. G., Bamford, K. B., Denning, T. L., Pappo, J., and Ernst, P. B. (2001a). Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion. *J.Immunol.* **167**, 926-934.
- Wang, X., Moser, C., Louboutin, J. P., Lysenko, E. S., Weiner, D. J., Weiser, J. N., and Wilson, J. M. (2002). Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J.Immunol.* **168**, 810-815.
- Wang, Z. Q., Bapat, A. S., Rayanade, R. J., Dagtas, A. S., and Hoffmann, M. K. (2001b). Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (FcγRIII) whose engagement blocks the cell death programme and facilitates differentiation. *Immunology.* **102**, 331-337.
- Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S., and Nakao, M. (1998). *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* **115**, 642-648.
- Wattrang, E., Berg, M., and Magnusson, M. (2005). Immunostimulatory DNA activates production of type I interferons and interleukin-6 in equine peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **107**, 265-279.
- Webb, D. C., Cai, Y., Matthaei, K. I., and Foster, P. S. (2007). Comparative roles of IL-4, IL-13, and IL-4Rα in dendritic cell maturation and CD4<sup>+</sup> Th2 cell function. *J.Immunol.* **178**, 219-227.
- Wiedemann, T., Loell, E., Mueller, S., Stoeckelhuber, M., Stolte, M., Haas, R., and Rieder, G. (2009). *Helicobacter pylori* cag-Pathogenicity island-dependent early immunological response triggers later precancerous gastric changes in Mongolian gerbils. *PLoS.ONE.* **4**, e4754.
- Wiethe, C., Debus, A., Mohrs, M., Steinkasserer, A., Lutz, M., and Gessner, A. (2008). Dendritic Cell Differentiation State and Their Interaction with NKT Cells Determine Th1/Th2 Differentiation in the Murine Model of *Leishmania major* Infection. *J.Immunol.* **180**, 4371-4381.
- Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V. S., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *Journal of Experimental Medicine.* **185**, 317-328.
- Wong, B. L., Zhu, S. L., Huang, X. R., Ma, J., Xia, H. H., Bucala, R., Wong, B. C., and Lan, H. Y. (2009). Essential role for macrophage migration inhibitory factor in gastritis induced by *Helicobacter pylori*. *Am.J.Pathol.* **174**, 1319-1328.
- Xia, H. H., Lam, S. K., Huang, X. R., Wong, W. M., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Lan, H. Y., and Wong, B. C. (2004). *Helicobacter pylori* infection is associated with increased expression of macrophage migratory inhibitory factor--by epithelial cells, T cells, and macrophages--in gastric mucosa. *J.Infect.Dis.* **190**, 293-302.
- Xie, Y., Zhou, N. J., Gong, Y. F., Zhou, X. J., Chen, J., Hu, S. J., Lu, N. H., and Hou, X. H. (2007). Th immune response induced by *H pylori* vaccine with chitosan as adjuvant and its relation to immune protection. *World J.Gastroenterol.* **13**, 1547-1553.
- Yamaguchi, S., Tatsumi, T., Takehara, T., Sasakawa, A., Hikita, H., Kohga, K., Uemura, A., Sakamori, R., Ohkawa, K., and Hayashi, N. (2008). Dendritic cell-based vaccines suppress metastatic liver tumor via activation of local innate and acquired immunity. *Cancer Immunol.Immunother.* ..

- Yamaoka, Y., Kwon, D. H., and Graham, D. Y. (2000). A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**, 7533-7538.
- Yamauchi, K., Choi, I. J., Lu, H., Ogiwara, H., Graham, D. Y., and Yamaoka, Y. (2008). Regulation of IL-18 in *Helicobacter pylori* infection. *J.Immunol.* **180**, 1207-1216.
- Yoh, K., Shibuya, K., Morito, N., Nakano, T., Ishizaki, K., Shimohata, H., Nose, M., Izui, S., Shibuya, A., Koyama, A., Engel, J. D., Yamamoto, M., and Takahashi, S. (2003). Transgenic overexpression of GATA-3 in T lymphocytes improves autoimmune glomerulonephritis in mice with a BXSB/MpJ-Yaa genetic background. *J.Am.Soc.Nephrol.* **14**, 2494-2502.
- Yokota, K., Kurebayashi, Y., Takayama, Y., Hayashi, S., Isogai, H., Isogai, E., Imai, K., Yabana, T., Yachi, A., and Oguma, K. (1991). Colonization of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of Mongolian gerbils. *Microbiol.Immunol.* **35**, 475-480.
- Yokota, S., Ohnishi, T., Muroi, M., Tanamoto, K., Fujii, N., and Amano, K. (2007). Highly-purified *Helicobacter pylori* LPS preparations induce weak inflammatory reactions and utilize Toll-like receptor 2 complex but not Toll-like receptor 4 complex. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **51**, 140-148.
- Yu, J. B., Feng, Z. X., and Zhan, R. Y. (2007). [Dendritic cells pulsed with glioma RNA induce immunity against intracranial gliomas]. *Zhejiang.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban.* **36**, 592-597.
- Yura, M., Takahashi, I., Terawaki, S., Hiroi, T., Kweon, M. N., Yuki, Y., and Kiyono, H. (2001). Nasal administration of cholera toxin (CT) suppresses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Vaccine.* **20**, 134-139.
- Zavros, Y., Rathinavelu, S., Kao, J. Y., Todisco, A., Del Valle, J., Weinstock, J. V., Low, M. J., and Merchant, J. L. (2003). Treatment of *Helicobacter* gastritis with IL-4 requires somatostatin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**, 12944-12949.
- Zhang, L., Danon, S. J., Grehan, M., Chan, V., Lee, A., and Mitchell, H. (2005). Natural colonization with *Helicobacter* species and the development of inflammatory bowel disease in interleukin-10-deficient mice. *Helicobacter.* **10**, 223-230.
- Zhang, S., Kim, C. C., Batra, S., McKerrow, J. H., and Loke, P. (2010). Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* **4**, e648.
- Zhang, X., He, P., Hu, Z., Wang, X., and Liang, Z. (2011). Enhanced specific immune responses by CpG DNA in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen and HB vaccine. *Viol.J.* **8**, 78.
- Zhang, X. W., Liu, Q., Wang, Y., and Thorlacius, H. (2001). CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. *Br.J.Pharmacol.* **133**, 413-421.
- Zhang, Y., Louboutin, J. P., Zhu, J., Rivera, A. J., and Emerson, S. G. (2002). Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T cell-mediated acute graft-versus-host disease. *J.Clin.Invest.* **109**, 1335-1344.
- Zhu, H. F., Qiu, W. H., Lei, P., Zhou, W., Wen, X., He, F. R., Li, L., Dai, H., Shen, G. X., and Gong, F. L. (2008). IL-10 gene modified dendritic cells inhibit T helper type 1-

---

mediated alloimmune responses and promote immunological tolerance in diabetes. *Cell Mol.Immunol.* **5**, 41-46.

## **Danksagung**

Prof. Dr. Dr. Hans Wolf danke ich dafür, dass er diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg ermöglicht hat.

Prof. Dr. Norbert Lehn danke ich einfach nur für alles.

Prof. Dr. Inga Neumann danke ich für die Vertretung dieser Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.

Bei Dr. Wulf Schneider möchte ich mich für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Dr. Gertrud Knoll, Maria Kurz, Dr. Michael Aigner und Dr. Alexander Eckhardt möchte ich für ihre unerschütterliche Hilfe bei allen kleinen und großen Problemen des Laboralltags danken.

Ein besonderer Dank geht an die Routine von PCR-Diagnostik, Pathologie und Mikrobiologie für ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung dieser Arbeit.

Peter Neumann und Tom Grundler danke ich für die Herstellung der Medien.

Zuletzt möchte ich mich noch bei allen, in irgendeiner Form an dieser Arbeit beteiligten Personen bedanken, die bisher nicht genannt wurden.

